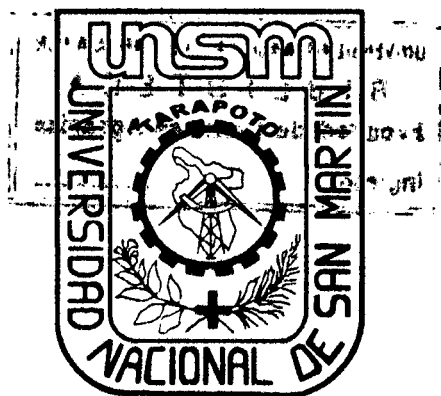


UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN - TARAPOTO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO AGROSILVO PASTORIL
ESCUELA ACADÉMICO - PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



TESIS

BIOCONTROL DE *Moniliophthora roreri* y *Phytophthora palmivora*
PATÓGENOS DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) CON HONGOS
ENDÓFITOS PROCEDENTES DEL ALTO AMAZONAS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AGRÓNOMO

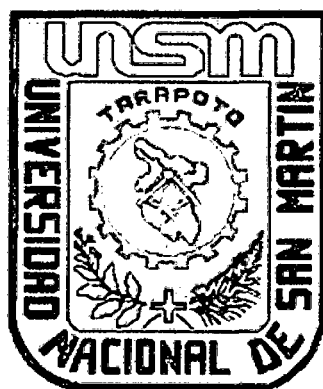
PRESENTADO POR EL BACHILLER:

MARCELINO ROJAS TORRES

TARAPOTO - PERÚ

2013

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN – TARAPOTO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO AGROSILVO PASTORIL
ESCUELA ACADÉMICO-PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



TESIS

**BIOCONTROL DE *Moniliophthora roreri* y *Phytophthora palmivora* PATÓGENOS DE CACAO (*Theobroma cacao* L.)
CON HONGOS ENDÓFITOS PROCEDENTES DEL ALTO
AMAZONAS**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AGRÓNOMO**

**PRESENTADO POR EL BACHILLER:
MARCELINO ROJAS TORRES**

**TARAPOTO – PERÚ
2013**

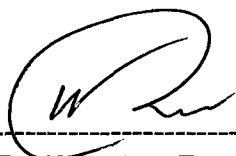
UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN-TARAPOTO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO AGROSILVO PASTORIL
ESCUELA ACADÉMICO-PROFESIONAL DE AGRONOMÍA
ÁREA DE MEJORAMIENTO Y PROTECCIÓN DE CULTIVOS

TESIS

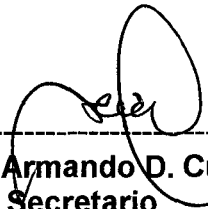
**BIOCONTROL DE *Moniliophthora roreri* y *Phytophthora palmivora* PATÓGENOS DE CACAO (*Theobroma cacao* L.)
CON HONGOS ENDÓFITOS PROCEDENTES DEL ALTO
AMAZONAS**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AGRÓNOMO**

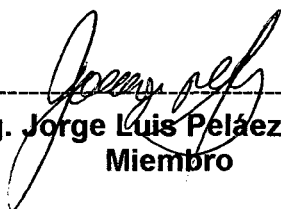
**PRESENTADO POR EL BACHILLER:
MARCELINO ROJAS TORRES**



Blgo. M.Sc. Dr. Winston Franz Ríos Ruíz
Presidente



Ing. M.Sc. Armando D. Cueva Benavides
Secretario



Ing. Jorge Luis Peláez Rivera
Miembro



Ing. Eybis José Flores García
Asesor

DEDICATORIA

A DIOS Y A MI FAMILIA

Dedico el éxito y la satisfacción de esta investigación a Dios quien me regala los dones de la sabiduría y el entendimiento, mi papa Juan Rojas que no se encuentra físicamente pero espiritualmente siempre nos acompaña dándonos su calor como siempre, a mí mamá Maritza Torres por el apoyo incondicional para lograr mis metas.

A mis hermanos Matilde, María y Manuel quienes han estado conmigo compartiendo y siendo parte de mi vida y formación personal, a Elvis y Aquiles, cuñados y hermanos que forman parte de mi familia, a mi querida Jheny por su apoyo constante y desinteresado.

A mis amigos, compañeros, familiares, y docentes por su gran calidad humana apoyo incondicional, amor, alegría y ánimo contagioso, que no me dejaron desfallecer para así poder culminar este proyecto.

AGRADECIMIENTO

Deseo expresar de todo corazón mis más sinceros agradecimientos a todas aquellas personas que me brindaron su colaboración, sus conocimientos, su ayuda incondicional y por sobre todo su amistad durante la realización de esta investigación. Este es el esfuerzo de un gran equipo de trabajo, a cada uno de ellos, Gracias.

A Dios, esa fuerza superior en quienes muchos no creen y se respeta.

A mi Asesor **Ing. Eybis José Flores García**, por dedicar su tiempo para orientarme, ser un gran docente y amigo.

Al Ing. MSc. **Enrique Arévalo Gardini**, Coordinador General del **Instituto de Cultivos Tropicales (ICT)**, y en especial a Ing. MSc. **Betsabe León Ttacca**, por el asesoramiento recibido y por brindarme las facilidades de laboratorio para poder trabajar el presente trabajo de investigación; además al proyecto INCAAGRO por el financiamiento de la investigación, y a toda la familia del ICT, en especial a mis amigos Kadir Márquez, Jaime Cayotopa, Delmar Cayotopa, Boris Gutarra, Juan Arévalo, Mar Gárate, Paquita Lao y Mayer Obando por ser ante todo cada uno amigos incondicionales de gran espíritu y calidad humana, en todo momento.

A mis compañeros tesisistas: Ginsberg, Juan Luís, Gina, María Julia, Erick, Jack y Juan Cueva, gracias por el apoyo en el proceso de desarrollo de la tesis.

A mi mamá **Maritza Torres García** gracias por el soporte incondicional, a **Jheny Rengifo Jesús** por estar en los momentos felices y también difíciles, me dieron fuerzas para seguir cuando quería declinar.

A Todos de nuevo, gracias.

CONTENIDO

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
III. REVISIÓN DE LITERATURA	4
3.1. Cultivo de cacao	4
3.1.1. Origen e importancia	4
3.1.2. Aspectos generales del cultivo de cacao	5
3.1.3. Botánica	5
3.1.4. Taxonomía	6
3.1.5. El cultivo de cacao en la región San Martín	7
3.2. Principales enfermedades del cacao en Perú	7
3.2.1. La “Monilia” o “Moniliasis”	8
3.2.1.1. Distribución geográfica	8
3.2.1.2. Taxonomía	9
3.2.1.3. Morfología	9
3.2.1.4. Ciclo de vida del patógeno	9
3.2.1.5. Sintomatología	10
3.2.1.6. Epidemiología	11
3.2.1.7. Rango de hospederos	11
3.2.2. Pudrición parda (<i>Phytophthora palmivora</i>)	12
3.2.2.1. Distribución geográfica	12
3.2.2.2. Taxonomía	12
3.2.2.3. Morfología	13
3.2.2.4. Ciclo de vida	13
3.2.2.5. Sintomatología	14
3.2.2.6. Epidemiología	15
3.3. Manejo de las enfermedades de cacao	16
3.3.1. Control de Moniliasis	16
3.3.2. Control de Pudrición Parda	17

3.4.	Control biológico de las principales enfermedades del cacao	19
3.4.1.	Moniliasis	19
3.4.2.	Pudrición parda	20
3.5.	Hongos endófitos como biocontroladores	20
3.5.1.	Rol de los hongos endófitos	21
3.5.1.1.	Micoparasitismo	22
3.5.1.2.	Antibiosis	24
3.6.	Metabolitos Primarios y Secundarios	25
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS	28
4.1.	Ubicación del experimento	28
4.2.	Origen de los hongos endófitos	28
4.3.	Selección y reactivación de los hongos endófitos	29
4.4.	Preparación de medios de cultivo	31
4.5.	Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i>	31
4.5.1.	Prueba de Antibiosis	31
4.5.2.	Prueba de Micoparasitismo	33
4.6.	Evaluación de la eficiencia de hongos endófitos en el control de <i>M. roreri</i> y <i>P. palmiovora</i> en hojas y frutos de cacao <i>in vitro</i>	34
4.6.1.	Eficiencia de hongos endófitos en la inhibición de la esporulación de <i>Moniliophthora roreri</i> en cilindros de frutos de cacao	35
4.6.1.1.	Metabolitos secundarios de hongos endófitos	35
4.6.1.2.	Suspensión de conidias de hongos endófitos	36
4.6.2.	Eficiencia de hongos endófitos en el control de <i>P. palmivora</i> mediante la técnica de discos de hojas	37
4.6.2.1.	Metabolitos secundarios de hongos endófitos	38
4.6.2.2.	Suspensión de conidias de hongos endófitos	40

4.7. Parámetros de evaluación	41
4.7.1. Porcentaje de Inhibición micelial de los patógenos	41
4.7.2. Porcentaje de micoparasitismo de los hongos endófitos hacia los patógenos	42
4.7.3. Porcentaje de inhibición de conidias de <i>M. roreri</i>	42
4.7.4. Grado de severidad de la pudrición parda en discos de hoja de cacao	43
4.8. Análisis estadístico de los datos	43
V. RESULTADOS	45
5.1. Capacidad antagónica de hongos endófitos hacia <i>P. palmivora</i> y <i>M. roreri</i> .	45
5.1.1. Antibiosis de hongos endófitos hacia <i>M. roreri</i> y <i>P. palmivora</i> .	45
5.1.2. Micoparasitismo de <i>Moniliophthora roreri</i> y <i>P. palmivora</i> por hongos endófitos	53
5.2. Eficiencia de hongos endófitos en el control de <i>M. roreri</i> y <i>P. palmivora</i> en frutos y hojas de cacao <i>in vitro</i>	63
5.2.1. Eficiencia de metabolitos secundarios de hongos endófitos en la inhibición de la esporulación de <i>Moniliophthora roreri</i> en cilindros de frutos de cacao	63
5.2.2. Eficiencia de suspensión de conidias de hongos endófitos en la inhibición de la esporulación de <i>Moniliophthora roreri</i> en cilindros de frutos de cacao	67
5.2.3. Eficiencia de metabolitos secundarios de hongos endófitos en el control de <i>P. palmivora</i> mediante la técnica de discos de hojas	71
5.2.4. Eficiencia de suspensión de conidias de hongos Endófitos en el control de <i>P. palmivora</i> en discos de hojas de cacao	75

VI.	DISCUSIONES DE RESULTADOS	79
VII.	CONCLUSIONES	82
VIII.	RECOMENDACIONES	84
IX.	BIBLIOGRAFÍA	85
	RESUMEN	
	SUMMARY	
	ANEXOS	

CONTENIDO DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1: Origen de aislamientos de hongos endófitos	30
Cuadro 2: Hongos endófitos con potencial de biocontrol a <i>P. palmivora</i> y <i>M. roreri</i>	34
Cuadro 3: Análisis de la Varianza (SC tipo III) de porcentaje de inhibición micelial de <i>M. roreri</i> en presencia de los metabolitos inhibitorios de Hongos endófitos	46
Cuadro 4: Análisis de la Varianza (SC tipo III) de inhibición micelial de <i>P. palmivora</i> en presencia de los metabolitos inhibitorios de Hongos endófitos	50
Cuadro 5: Análisis de la Varianza (SC tipo III) del porcentaje de micoparasitismo de Hongos endófitos hacia <i>P. palmivora</i>	58
Cuadro 6: Análisis de la varianza (SC Tipo III) de la inhibición de conidias de <i>M. roreri</i> en presencia de metabolitos secundarios de hongos	64
Cuadro 7: Prueba de Duncan al porcentaje de inhibición de conidias en tejidos de frutos infectados por <i>M. roreri</i> , en presencia de metabolitos secundarios de hongos endófitos	64
Cuadro 8: Análisis de la varianza (SC Tipo III) de la inhibición de conidias de <i>M. roreri</i> en presencia de suspensión de conidias de hongos endófitos	68
Cuadro 9: Prueba de Duncan al porcentaje de inhibición de conidias en tejidos de frutos infectados por <i>M. roreri</i> , en presencia de suspensión de conidias de hongos endófitos	68
Cuadro 10: Análisis de la varianza (SC Tipo III) del grado de severidad de la infección de <i>P. palmivora</i> en discos de hojas en presencia de metabolitos inhibitorios de hongos endófitos	72
Cuadro 11: Prueba de Duncan al grado de severidad de <i>P. palmivora</i> , en discos de hojas, en presencia de matabolitos secundarios de hongos endófitos	72
Cuadro 12: Análisis de la varianza (SC Tipo III) del grado de severidad de la infección de <i>P. palmivora</i> en discos de hojas en presencia de suspensión de conidias de hongos endófitos	76
Cuadro13: Prueba de Duncan al grado de severidad de <i>P. palmivora</i> , en discos de hojas, en presencia de suspensión de conidias de hongos endófitos	76

CONTENIDO DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Estación Experimental “Juan Bernito” – ICT	28
Figura 2: Mapa de las cuencas tributarias del Amazonas y Ubicación de las localidades	29
Figura 3: Prueba de antibiosis	32
Figura 4: Prueba de micoparasitismo	33
Figura 5: Método de inhibición de conidias de <i>M. roreri</i> en cilindros de cascara de cacao infectado con la enfermedad	37
Figura 6: Escala de evaluación según el tamaño e intensidad de síntomas	41
Figura 7: Prueba de infección de <i>P. palmivora</i> en discos de hojas	41
Figura 8: Porcentaje de inhibición micelial de <i>M. roreri</i> en presencia metabolitos inhibitorios de Hongos endófito	47
Figura 9: Comportamiento del crecimiento micelial de <i>M. roreri</i> en presencia de metabolitos inhibidores de los aislamientos de diez géneros de hongos endófitos	48
Figura 10: Porcentaje de inhibición micelial de <i>P. palmivora</i> en presencia de metabolitos secundarios de aislamientos de hongos endófitos	51
Figura 11: Comportamiento del crecimiento micelial de <i>P. palmivora</i> en presencia de metabolitos secundarios de los aislamientos de diez géneros de hongos endófitos	52
Figura 12: Porcentaje de micoparasitismo de <i>M. roreri</i> por aislamientos de Hongos endófitos	55
Figura 13: Colonización de hongos endófitos en placas precolonizadas por <i>M. roreri</i>	56
Figura 14: Reaislamiento de placas precolonizadas por <i>M. roreri</i> a partir de colonias micoparasitadas por aislamientos de diez géneros de hongos endófitos	57
Figura 15: Porcentaje de micoparasitismo de <i>P. palmivora</i> por aislamientos de Hongos endófitos	60

Figura 16:	Micoparasitismo de hongos endófitos en placas precolonizadas por <i>P. palmivora</i>	61
Figura 17:	Reaislamiento de <i>P. palmivora</i> a partir de colonias micoparasitadas por aislamientos de diez géneros de hongos endófitos	62
Figura 18:	Porcentaje de inhibición de conidias de <i>M. royeri</i> en la prueba de cilindros de tejidos infectados en presencia de metabolitos secundarios de hongos endófitos	65
Figura 19:	Cilindros de frutos infectados por moniliasis en presencia de metabolitos secundarios de hongos endófitos en la prueba de inhibición de conidias.	66
Figura 20:	Porcentaje de inhibición de conidias de <i>M. royeri</i> en la prueba de cilindros de tejidos infectados en presencia de suspensión de conidias de hongos endófitos	69
Figura 21:	Cilindros de frutos infectados por moniliasis en presencia de suspensión de conidias de <i>Trichoderma</i> endófito	70
Figura 22:	Grado de severidad de la infección de <i>P. palmivora</i> en discos de hojas en presencia de metabolitos secundarios de hongos endófitos	73
Figura 23:	Prueba de severidad de la infección de <i>P. palmivora</i> en discos de hojas en presencia de metabolitos secundarios de hongos endófitos	74
Figura 24:	Grado de severidad de la infección de <i>P. palmivora</i> en discos de hojas en presencia de suspensión de conidias de hongos endófitos	77
Figura 25:	Prueba de severidad de la infección de <i>P. palmivora</i> en discos de hojas en presencia de suspensión de conidias de hongos endófitos	78

I. INTRODUCCIÓN

La producción de cacao se ha convertido en una importante actividad económica de San Martín, se cultivan 28, 864 hectáreas para producir 12, 440 toneladas métricas de cacao que representa el 33% de la producción nacional, este crecimiento en la producción resulta notable con diferencia de las condiciones que se producía hace una década, además son más de 25 mil familias involucradas en la producción de cacao y chocolate en el país (Zubiate, 2011).

No obstante el gran potencial del cacao y el panorama cacaotero presenta grandes limitaciones de enfermedades como: *Moniliophthora roreri*, *Phytophthora palmivora* y *Moniliophthora perniciosa*, causando pérdidas de su producción hasta 75% en los últimos 16 años (Markes, 2010).

La integración de las prácticas de manejo del cacao y su utilización eficiente son importantes para la sostenibilidad del cultivo; estas actividades involucran la realización de prácticas culturales, fitosanitarias, químicas, físicas, genéticas y biológicas (Arévalo, 2010).

El control biológico, constituye una práctica ampliamente difundida y sigue siendo objeto de investigación y desarrollo, en la actualidad los organismos endófitos han recibido una creciente atención por su capacidad simbiótica con diferentes plantas (Salgado *et al.*, 2005). Una de estas es el cacao que presenta una compleja

comunidad microbiana de endófitos que prometen ser candidatos para el biocontrol de enfermedades del cacao (Bailey, 2008).

Los hongos endófitos son organismos que viven en asociación con plantas en la mayor parte o en todo su ciclo de vida, y se encuentran en los espacios intercelulares y, algunas veces, intracelularmente en las hojas y los tallos de muchas plantas, es así que muchos endófitos protegen a sus hospedantes (plantas) produciendo mycotoxinas que disuaden a los herbívoros de atacarlos y antibióticos u otras sustancias que suprimen patógenos (Salgado *et al.*, 2005).

La presente investigación tiene como finalidad seleccionar hongos endófitos con capacidad antagónica de los principales patógenos de cacao, *Moniliophthora roreri* y *Phytophthora palmivora*, y así encontrar una alternativa de control biológico, frente a los métodos convencionales, como el uso de productos químicos, que causan impactos negativos en el medio ambiente, el uso de endófitos reduciría las posibilidades de utilización de insumos contaminantes como plaguicidas, además constituirá una alternativa de control de enfermedades fungosas reduciendo los costos de producción e incrementarían la rentabilidad del cultivo, contribuyendo de esta manera a la sostenibilidad del cultivo en beneficio de los agricultores.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Seleccionar hongos endófitos procedentes del Alto Amazonas con capacidad de biocontrol a *Moniliophthora roreri* y *Phytophthora palmivora*, patógenos de cacao (*Theobroma cacao* L.).

2.2 Objetos específicos

Determinar la capacidad antagónica *in vitro* de hongos endófitos procedentes del Alto Amazonas sobre *Moniliophthora roreri* y *Phytophthora palmivora* patógenos de cacao (*Theobroma cacao*).

Evaluar la eficiencia de hongos endófitos en el control de *Moniliophthora roreri* y *Phytophthora palmivora* en hojas y frutos de cacao (*Theobroma cacao*) en condiciones de laboratorio *in vitro*.

III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1 Cultivo de cacao

3.1.1 Origen e Importancia

El género *Theobroma* es originario de la cuenca alta del río Amazonas. Posee algunas especies de gran relevancia económica en los trópicos, principalmente *Theobroma cacao* y en mucho menor grado *T. grandiflorum* y *T. bicolor*. Las semillas de *T. cacao* se han empleado a lo largo de la historia para la preparación de bebidas y otros alimentos, como moneda, bebida ceremonial y tributo a reyes. Esta especie se encuentra actualmente distribuida a lo largo de las regiones lluviosas de los trópicos, desde los 20° de latitud norte hasta los 20° de latitud sur (ICCO, 2003), es decir desde México, hasta el sur de la Amazonia en Brasil y Bolivia.

El cacao es un cultivo estrictamente tropical, pero se elabora y consume más en regiones templadas, principalmente como bebida estimulante y como alimento energético (chocolate) por su contenido de teobromina y trazas de cafeína (León, 2000).

3.1.2 Aspectos generales del cultivo de cacao

Theobroma cacao fue el nombre dado por Linnaeus al árbol de cacao en la primera edición de *Species Plantarum*. La primera palabra del nombre de esta especie significa “alimento de los dioses” (Toxopeus, 1985; Baker, 1891). El género *Theobroma* se divide en seis secciones que contienen 22 especies, de estas *T. cacao* es la única que es cultivada ampliamente (Toxopoeus, 1985).

3.1.3 Botánica

El árbol de cacao crece hasta alcanzar 10 metros de altura cuando está a la sombra de altos árboles forestales. En forma silvestre bajo la fuerte sombra del bosque primario ellos pueden crecer hasta 20 m. (ITC, 2001 y Barahona, 1987).

La planta de cacao tiene una raíz principal, que crece a más de un metro de profundidad y sirve para sostener a la planta. También tiene muchas raíces secundarias que se encuentran distribuidas alrededor del árbol y a poca profundidad. Las hojas de la planta son de forma alargada, medianas y de color verde, algunas plantas tienen las hojas tiernas y de diferentes colores que pueden ser: café claro, verde pálido, morados o rojizos, según la variedad del cultivo.

Las **flores** nacen en grupos pequeños llamados cojines florales y se desarrollan en el tronco y ramas principales, estas salen donde antes

hubieron hojas y siempre nacen en el mismo lugar; por eso, es importante no dañar la base del cojín floral para mantener una buena producción. De las flores se desarrollan los frutos o mazorcas con ayuda de algunos insectos pequeños (Melba e Isidro 2006).

El fruto es una mazorca de 15 a 25 cm de largo, dentro de la cual se encuentran las semillas embebidas en una pulpa mucilaginosa; el número de semillas puede variar de 30 a 40, las que se convierten en el grano del cacao después de ser fermentadas y secadas, las mazorcas brotan del tronco principal y de las ramas de la copa (ITC, 2001; Wood y Lass, 1985).

Melba e Isidro (2006), mencionan que las semillas están dentro de las mazorcas y son planas o redondeadas, de color blanco, café o morado. Están ubicadas en cinco hileras dentro del fruto.

3.1.4 Taxonomía

Reino : Plantae (plantas)

Subreino: Tracheobionta (plantas vasculares)

División: Magnoliophyta (angiospermas)

Clase : Magnoliopsida (dicotiledóneas)

Subclase : Dilleniidae

Orden : Malvales

Familia : Sterculiaceae

Subfamilia : Byttnerioideae

Género : *Theobroma*

Especie : *Theobroma cacao* L.

3.1.5 El cultivo de cacao en la región San Martín - Perú

La región San Martín cuenta con condiciones climáticas y edafológicas favorables para la plantación del cacao. Por otro lado, si bien existen varias zonas productoras, las principales son Juanjuí, Saposo, Tarapoto y Tocache (MINAG, 2003), y tiene gran potencial para ampliar la frontera agrícola para la generación de mayor oferta. Por otro lado, el rendimiento de la producción en la región no es uniforme en todas las zonas, primordialmente debido al nivel tecnológico utilizado. No obstante, el promedio alcanzado en el 2003 fue de 647,55 kg/ha, lo cual es considerado óptimo si se le compara con el promedio nacional que fue de 525 kg/ha. (MINAG, 2005).

La producción de cacao se ha convertido en la primera actividad económica de San Martín, se cultivan 28, 864 hectáreas para producir 12, 440 toneladas métricas de cacao que representa el 33% de la producción nacional (Zubiate, 2011).

3.2 Principales enfermedades del cacao en Perú

Los principales problemas fitosanitarios son la moniliasis: *Moniliophthora roreri*; escoba de bruja: *Moniliophthora perniciosa*; pudrición parda, chancro o gomosis: *Phytophthora palmivora*; muerte repentina: *Verticilium dahliae*; mal de machete: *Ceratocystes fimbriata*; pie negro: *Rosellinia* spp (Arévalo, 2010); además el virus CSSV y la Muerte lenta vascular. Con excepción de CSSV, estas enfermedades son causadas por hongos (ITC, 2001).

3.2.1 La “Monilia” o “Moniliasis”

3.2.1.1 Distribución geográfica

La moniliasis es causada por el hongo *Moniliophthora roreri*, Cif y Par. (Evans *et al.*, 2002), es conocida también como Pudrición acuosa, Helada, Mancha, Ceniza o Enfermedad de Quevedo. Según Phillips (2003), se encuentra distribuida en América Tropical y existen reportes que evidencian la enfermedad en: Guatemala (2002), Nicaragua (López y Enríquez 1980), Costa Rica (Enríquez y Suárez 1978), Ecuador (Jorgensen 1970), Panamá, Perú y Venezuela (Orellana 1956) y Colombia (Anon 1832).

Mclaughlin (1950), reportó la enfermedad en los departamentos de Cajamarca, Huánuco y Cuzco de Perú; este reporte fue controversial hasta cuando Hernández *et al.*, (1990) reportaron la presencia del hongo en el departamento del Amazonas (Perú). Para 1999, cerca del total de plantaciones de cacao en el Perú, estaban afectadas por *M. roreri* (Phillips-Mora y Wilkinson, 2007).

En 1991 se la observó en Tingo María. En 1994 se detectó en Pasco y en 1995 se había diseminado al Valle de los Ríos Apurímac y Ene (VRAE), la zona con mayor área sembrada con cacao en el país, que comprende territorios de Junín, Ayacucho y Cusco. En 1998 se confirmó su presencia en el Valle del Río Urubamba, provincia de la Convención, Cusco. Este mismo año se lo identificó también en Junín. La enfermedad está diseminada prácticamente en todas las áreas cacaoteras significativas del país.

3.2.1.2 Taxonomía

Según Evans *et al.*, 2003, pertenece a:

Reino : Fungi

Filum : Oomycota

Clase : Deutoromicetes

Orden : Moniliales

Familia : Tricholomataceae

Género : *Moniliophthora*

Especie : *M. roreri*.

3.2.1.3 Morfología

Las esporas son multifuncionales, sirven no sólo para el intercambio genético, sino también para la dispersión, la infección y la supervivencia (Evans, 2007). Éstas pueden ser esféricas u ovaladas y tienen dos formas de germinación a través del poro germinativo o directamente a través de su pared (Urquillas, 2004).

3.2.1.4 Ciclo de vida del patógeno

El ciclo comienza con la estación seca, época en la que se encuentran la mayor cantidad de esporas disponibles en el ambiente. Sin embargo, para que inicie la infección es necesario que existan condiciones de humedad, se resalta que los conidios sólo germinan en presencia de una película de agua, con mayor germinación cerca de los 24° C. La hifa infectiva del hongo penetra la epidermis del fruto, desde la cual se propaga inter e intracelularmente a los tejidos subepidermales y el exocarpo.

La infección continúa a los tejidos centrales, incluyendo las semillas, e inicia el desarrollo de la necrosis desde la parte interna hacia la epidermis. Externamente, la infección aparece como puntos aceitosos muy pequeños y circulares, los cuales se convierten en lesiones (manchas) irregulares de color amarillo y marrón.

El proceso desde la infección a la aparición de mancha tiene una duración aproximada de 60 ± 10 días, dependiendo de la susceptibilidad del clon de cacao. Entre 3 y 4 días, se desarrolla el micelio blanco sobre las lesiones y luego aparecen las esporas, las cuales confieren un color crema a marrón. Los primeros síntomas aparecen en promedio a los 22 días, después de la inoculación del patógeno, y 73 días para la esporulación (Merchán, 1981).

3.2.1.5 Sintomatología

La enfermedad ataca solamente los frutos del cacao a cualquier edad, donde la severidad del ataque varía según la zona y época del año y de acuerdo con las condiciones del clima. Aparentemente las temperaturas altas son más favorables para la diseminación del patógeno. Los síntomas generalmente se presentan a nivel externo, donde ocasionan necrosis, deformación y pudrición, en mazorcas de 60 a 80 días de edad, es posible apreciar tejido interno necrosado (Reuck, 1997).

3.2.1.6 Epidemiología

La esporulación del hongo sobre la superficie del fruto es tan intensa que las nubes de esporas son liberadas y transportadas por el viento, la lluvia y en menor proporción por insectos (Evans, 1986). Se estima que las densidades de esporulación del hongo sobre un fruto pueden alcanzar los 44 millones de esporas por cm² de área. Una mazorca esporulada ubicada a una altura aproximada de dos metros tiene un gradiente de dispersión, con capacidad de infección de 40%, de hasta una distancia de 20m (Merchán, 1981).

Las esporas pueden ser aisladas de los mismos frutos momificados, incluso después de un año de la infección, lo que es garantía de la oferta de inóculo durante ese tiempo (Evans, 1981). Al menos 90% de las esporas pueden germinar sobre medios artificiales, pero sólo 10% lo puede hacer sobre agua (Ram *et al.*, 2004). Los frutos momificados y esporulados en la copa del árbol son considerados la principal fuente de inóculo para iniciar la epidemia, diseminando las esporas en sentido descendente. La presencia de agua libre no sólo permite la germinación de las esporas, sino que remueve el inóculo desde estos frutos (Aranzazu, 1987; Cubillos, 1981).

3.2.1.7 Rango de hospedantes

Moniliophthora roreri ha sido reportado solamente en especies de los géneros *Theobroma* y *Herrania*. Rorer en 1918 reportó el ataque de frutos de *T. bicolor* y *H. balaensis* en Ecuador. Baker *et al.*, (1954) reportaron infecciones en *T. gireli*. Además, Evans (1981) reportó infecciones de *M.*

roreri en *T. mammosum*, *T. simiarum*, *T. sylvestre*, *T. angustifolium*, *H. nítida*, *H. pulcherrima*. Posteriormente, Enríquez y Soria (1981) identificaron el patógeno en *T. grandiflora* y *H. purpurea* (Cuhn, 2006).

3.2.2 Pudrición Parda (*Phytophthora palmivora*)

3.2.2.1 Distribución geográfica

El género *Phytophthora* se encuentra distribuido en todo el mundo; predominan diferentes especies de acuerdo con la zona geográfica y el hospedero. En cacao se han reportado siete especies patógenas: *P. palmivora*, *P. megakarya*, *P. capsici*, *P. citrophthora*, *P. nicotianae* var. *Parasitica*, *P. megasperma* y *P. arecae*.

La especie de *P. palmivora* se encuentra ampliamente distribuida en las regiones tropicales con climas cálidos y de alta pluviosidad (Stamps, 1998) y es responsable de 20% a 30% de pérdidas anuales de la producción mundial de grano y aproximadamente 10% de muerte de árboles (Guest, 2007).

3.2.2.2 Taxonomía

Según Griffith *et al.*, 1992, pertenece a:

Reino : *Chromalveolata*

Filum : *Heterokontophyta*

Clase : *Oomycetes*

Orden : *Pythiales*

Familia : *Pythiaceae*

Género : *Phytophthora*

Especie : *P. palmivora*

3.2.2.3 Morfología

La especie con mayor importancia en sur América es *P. palmivora*, presenta las siguientes características: las hifas de esta especie son completamente uniformes, pocas veces sobrepasan los 5 μm de diámetro. A menudo, esta especie produce clamidiosporas con diámetro entre 30-35 μm en abundancia y en las primeras fases de desarrollo. Los esporangióforos son estrechos, simpoidales simples y con paredes muy bien definidas. Los esporangios se forman fácilmente sobre medio de cultivo, estos son elipsoides u ovoides con un tamaño de 35 – 60 μm x 20 – 40 μm y puede llegar hasta 90 x 45 μm . (Stamps, 1998).

3.2.2.4 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *Phytophthora* sp involucra tanto el estado asexual como el sexual, que se presentan dependiendo de las condiciones ambientales. Predomina el estado asexual, el cual inicia cuando la estructura vegetativa o esporangio germina, y en condiciones óptimas de humedad (agua libre) y temperatura (15°– 38° C) libera las zoosporas. Éstas son estructuras (esporas) móviles, de vida corta y poseen dos flagelos, uno anterior y otro posterior. El anterior es el responsable de movilizar la zoospora a través del agua (hasta 1,5 cm), mientras que el flagelo posterior actúa como una hélice que le da la dirección a la célula (Judelson y Blanco, 2005; Walker y Van West, 2007). Las zoosporas cumplen dos papeles fundamentales para el ciclo de vida del patógeno: 1) transmisión del patógeno de un hospedero a

otro y 2) dar la orientación del patógeno hacia el sitio de infección (hospedero) (Walker y Van West, 2007).

3.2.2.5 Sintomatología

La mazorca negra, causada por especies de *Phytophthora*, inicia sobre la superficie de la mazorca con una mancha descolorida, sobre la que posteriormente se desarrolla una lesión chocolate o negra con límites bien definidos. En dos semanas, ésta se empieza a dispersar hasta alcanzar toda la superficie de la mazorca. Sobre mazorcas mayores a tres meses de edad, las infecciones inician principalmente en la punta o al final del pedúnculo que une a la mazorca (McMahon y Purwantara, 2004).

Además *Phytophthora* produce cáncer en el tallo, se caracteriza por el desarrollo de un área necrótica marrón en la corteza, alrededor del tronco. Cuando se raspa la superficie de la corteza afectada, el tejido expuesto se torna de acuoso a pegajoso y de un color opaco gris parduzco a un color rojizo claro. La necrosis no se extiende más allá de la capa del cadmium. En el caso de un cáncer grande, éste puede rodear en círculo el tronco, causando la muerte súbita del árbol. Los cánceres en cojines florales resultan de la contaminación con cuchillos de cosecha o por la visita de insectos vectores (McMahon y Purwantara, 2004).

El patógeno ataca naturalmente tanto hojas muertas endurecidas como tejidos de tallos verdes jóvenes. A menudo *Phytophthora* sp también afecta

hojas maduras, aunque esto no se suele considerar como un problema serio. Las infecciones de las hojas y tallos influorescentes puede conducir a la muerte del punto de crecimiento o de toda la planta en el caso de plántulas, ocasionando cánceres en la corteza cuando el patógeno se dispersa hacia un chupón. Dado que las plántulas de cacao crecen muy rápido durante los primeros meses, las hojas jóvenes son muy susceptibles al ataque del patógeno (Mcmahon y Purwantara, 2004).

3.2.2.6 Epidemiología

El inicio del proceso de infección depende en gran medida de las condiciones ambientales, la humedad relativa alta y las bajas temperaturas, características de la época de lluvias, son favorables para la liberación de las zoosporas del esporangio y su dispersión (Efombagn *et al.*, 2004).

Después de su liberación, las zoosporas responden a estímulos generados por el hospedero y a los 20 y 30 minutos se enquistan en el material vegetal. El proceso de infección inicia después de esta etapa, la zoospora pierde los flagelos y germina (Iwaro *et al.*, 1999).

El desarrollo de la enfermedad está determinado por varios factores que tienen que ver con las características morfogénicas, las cargas iónicas de la planta, los factores ambientales, también la frecuencia y tamaño de los estomas, ya que se cree que el patógeno penetra a través de éstos (Iwaro *et al.*, 1999).

En condiciones de humedad, se pueden producir alrededor de 4 millones de esporangios sobre una mazorca. Estos son diseminados por el viento, la lluvia, los insectos, los restos vegetales de la cosecha, las herramientas contaminadas de la poda y el suelo; de esta forma se inicia un nuevo ciclo de la enfermedad (Flood y Murphy, 2004). *P. palmivora* y *P. Megakarya* infectan chupones y troncos causando cáncer. Cuando el cáncer se encuentra sobre la base del tronco, la infección llega hasta las raíces.

3.3 Manejo de las enfermedades de cacao

3.3.1 Control de Moniliasis

Para el combate de la Monilia se ha recomendado un manejo de la sombra que permita un mayor paso de luz y una mayor aireación para reducir la humedad del ambiente, realizar podas periódicas, cosechar los frutos maduros, evitar el encharcamiento del cultivo y eliminar los frutos afectados enterrándolos, tratando de no diseminar las esporas del hongo por la plantación (Evans, 1981). Según Enríquez (2004), es recomendable visitar periódicamente la plantación, para recolectar cada 5 a 7 días mazorcas enfermas, que producen esporas y transmiten la enfermedad a frutos sanos. Esta práctica junto con la poda y la cosecha complementan los métodos de control (Compañía nacional de chocolates, 1988).

El uso de fungicidas protectores de base cúprica, con aplicaciones cada siete a quince días incrementa el costo de producción, sin mencionar el daño que se causa al ambiente y la resistencia que se genera en el patógeno

(Suárez, 1997). Otros estudios indican la compatibilidad existentes entre bacterias promisorias combinadas con agentes agroquímicos y fertilizantes usados en las prácticas de cultivo no orgánico, que ocasionan efecto de antagonismo en el control de la enfermedad (Muñoz *et al.*, 2003).

Krauss y Soberanis (2001), reportan trabajos de control biológico realizados en América Central y del Sur, donde señalan menor incidencia de monilia y escoba de bruja (14,6% y 24,9%), aplicando mezclas de agentes antagonistas como: *Clonostachys rosea* y *Trichoderma* spp.

3.3.2 Control de Pudrición Parda

Los mecanismos de control contemplados para el manejo de la enfermedad de la pudrición parda son los de naturaleza sintética (fungicidas) pero aunado a su alto costo de adquisición está muy activa la tendencia a producir cacao con sello verde (orgánico) por lo que en la actualidad se hace empleo de prácticas de manejo cultural tales como: un programa de podas tanto de formación así como de saneamiento, eliminación de mazorcas enfermas, reducción de la cantidad de sombra y la adopción de una filosofía de cambiar los materiales sembrados por materiales resistentes (Lawrence, 1978; Enríquez, 2004).

Estos tres enfoques tanto el cultural, como el sintético y el uso de materiales resistentes, deben combinarse con adopciones culturales tales como: la reducción de cantidad de sombra, recolección de mazorcas maduras cada 8

a 15 días, tumba de mazorcas negras durante la cosecha, tratamiento de los montones de cáscaras con caldo bordelés, aspersión de fungicidas cúpricos orgánicos y uso de híbridos resistentes (Enríquez, 2004).

Métodos biológicos son usando tales como hongos y bacterias los cuales han sido investigados en laboratorios y en el campo, pero estos organismos no están disponibles comercialmente (Cabi Bioscience, 2002). *Trichoderma martiale* es un microorganismos eficientes para evitar la colonización por *P. palmivora*, este microorganismo reduce progresivamente la severidad de la enfermedad causada por este fitopatógeno (Tong *et al.*, 1983; Rogério *et al.*, 2010).

Las concentraciones aplicadas para realizar aspersiones a las plantas atacadas por *P. palmivora* van entre un 1×10^4 y 5×10^7 conidios por mililitro de suspensión, las aplicaciones pueden ser 3 veces al año en épocas de lluvia (Rogério *et al.*, 2010).

En 1987, se hizo un estudio cuyo objetivo era encontrar organismos antagonista de diferentes hongo entre ellos *P. palmivora* en la superficie de los órganos atacados por estos patógenos; probar el antagonismos de estos organismos y estudiar la condiciones que favorezcan su actividad. Para ellos, se aislaron bacterias epifitas de las superficies de las mazorcas de cacao. En condiciones de laboratorio y de campo se estudió el antagonismo para el control de *P. palmivora* en las pruebas realizadas de laboratorio e

invernadero se aisló es *Pseudomonas fluorescens* que mostro actividad antagonista con el fitopatógeno (CATIE, 2010).

3.4 Control biológico de las principales enfermedades del cacao

Según Baker y Cook (1974), se entiende por control biológico la reducción de la densidad o de las actividades productoras de enfermedades de un patógeno o parásito, en su estado activo o durmiente, lograda de manera natural o a través de la manipulación del ambiente, del hospedero o de antagonistas del patógeno o plaga que se quiere controlar. El método de control biológico implica el uso de organismos vivos para reducir el inóculo del patógeno. Un ejemplo de este método es el empleo de plantas trampa y el uso de organismos antagonistas. En el caso específico de los microorganismos antagonistas, estos actúan inhibiendo el crecimiento del patógeno ya sea mediante la producción de antibióticos o toxinas y mediante el parasitismo de las estructuras del patógeno directamente. Otra forma de actuar de estos microorganismos es la competencia por espacio o nutrientes, lo cual también limita el crecimiento del patógeno (Agrios, 2003).

3.4.1 Moniliasis

Las estrategias del control biológico para manejar la moniliasis se está investigando en Perú, Panamá y Costa Rica (Krauss y Soberanis, 2001; 2002). Esto implica el uso de los agentes naturales capaces de parasitar hongos patógenos. Aunque los resultados de la aplicación del biocontrol junto con la fitosanitación ha reducido pérdida de la mazorca e

incrementando la producción de cacao en plantaciones abandonadas (Krauss y Soberanis, 2002). Hasta la fecha muchos trabajos de investigación de biocontrol han involucrado a miembros del género *Trichoderma*.

3.4.2 Pudrición parda

Por otro lado en los últimos años se han adelantado investigaciones en control biológico de *Phytophthora* con resultados promisorios in vitro, pues no existen productos comerciales. Los resultados sugieren que las poblaciones de hongos endófitos presentes en los tejidos del cacao pueden proteger al árbol cuando éstos son aislados, seleccionados y reintroducidos al sistema del cultivo en un tamaño de población más grande, la cual protege contra *Phytophthora* sp. (Guest, 2007); tal es el caso de especies de *Geniculosporium*, que fueron aisladas de hojas sanas de cacao en Camerún (Tondje *et al.*, 2006).

3.5 Hongos Endófitos como biocontroladores

El término endófito fue introducido por De Bary (1866) y fue inicialmente aplicado para algunos organismos encontrados dentro de la planta (Wilson, 1995). El significado del término endófito fue refinado con el tiempo con la adición de una nueva información. Así el término endófito se refiere a todos los organismos habitantes de órganos de la planta que en algún tiempo de su vida pueden colonizar los tejidos internos de la planta sin causar daños aparentes en el hospedante. Esta definición de endófitos fue la más usada y

también incluye a los organismos que tienen más o menos fases epífitas largas y también a patógenos latentes (Petrini, 1991).

Estudios sobre la composición de los endófitos en diferentes hospedantes han identificado organismos con roles variables dentro de su hospedante. Organismos que tienen asociación parasítica débil, infección localizada, infección quiescente, infección latente y relación parasítica agresiva con sus hospedantes (Agrios, 2005).

En el suelo existen diversos microorganismos con capacidad antagónica hacia microorganismos fitopatógenos, pero el más estudiado es *Trichoderma*, debido a su fácil y rápido crecimiento además de sus características de micoparasitar a otros hongos (Howell y Stipanovic, 1995). Sin embargo, existen otras especies fúngicas que potencialmente pueden inhibir o limitar el crecimiento de los patógenos (Paul, 1999a; 1999b), como es el caso de algunas especies de *Aspergillus* (Alfonso *et al.*, 1992; Lourenço *et al.*, 2006; Suárez–Estrella *et al.*, 2007).

3.5.1 Rol de los hongos endófitos

Endófitos han sido previamente definidas como mutualista y están estrechamente relacionados a patógenos virulentos, pero tienen limitada patogenicidad, y probablemente han evolucionado directamente de los hongos patogénicos de las plantas (Carrol, 1988). La simbiosis mutualista incluye la falta de destrucción de muchas células o tejidos, ciclos de

nutrientes y químicos entre los hongos y hospedantes, capacidad fotosintética mejorada de la célula y tejido bajo la influencia de infección, mejora la sobrevivencia de hongos, y una tendencia hacia la gran especificidad del hospedante que es parecido en infecciones necrotróficas (Lewis, 1973).

No es fácil determinar con precisión los mecanismos que intervienen en las interacciones entre los antagonistas y los patógenos sobre la planta o en las heridas. En general los antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiplicidad de modos de acción es una característica a seleccionar en un antagonista. Se han descrito varios mecanismos de acción de los antagonistas para controlar el desarrollo de patógenos sobre fruta. Ellos son: antibiosis, competencia por espacio o por nutrientes, interacciones directas con el patógeno (micoparasitismo, lisis enzimática), e inducción de resistencia (Cook y Baker, 1983).

3.5.1.1 Micoparasitismo

Se refiere al hecho de que un microorganismo parasite a otro. Puede ser definido como una simbiosis antagónica entre organismos. El parasitismo consiste en la utilización del patógeno como alimento por su antagonista. Generalmente se ven implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasas, celulasas, b-1-3-glucanasas y proteasas que lisan o digieren las paredes de los hongos (Melgarejo, 1989; Ulhoa, 1996).

Otro autor define al micoparasitismo como “la interacción antagónica entre dos hongos”; es decir, el parasitismo de un hongo (hospedero) por otro hongo (micoparásito) a través de una síntesis de exoenzimas hidrolíticas para facilitar la degradación de la pared celular del hospedero (Manocha, 1991; Bruce *et al.*, 1995). Cuando un hongo parásito ataca directamente a un hongo patógeno, en un sistema biótico, es un micoparásito (Inbar y Chet, 1997).

La secuencia de pasos que sigue el proceso de micoparasitismo, se puede resumir en el reconocimiento que incluye la localización y crecimiento quimiotrópico, ataque (enrollamiento), lisis (por la excreción de enzimas) y degradación celular del hospedero para adquirir nutrientes (Bruce *et al.*, 1995).

Basado en el modo de micoparasitismo, se dividen en dos grupos: Biotróficos y Necrotróficos (Barnett y Binder, 1973). Los biotróficos tienen un rango de hospedantes restringido y producen estructuras especializadas para absorber los nutrientes, son capaces de obtener nutrientes de la célula viva hospedera (Manocha, 1991; Inbar y Chet, 1997), existen pocos casos de biocontrol de este tipo, entre ellos, *Sporidesmium sclerotivorum* Uecker, Ayers y Adams y *Ampelomyces quisqualis* (Chet *et al.*, 1997).

Los necrotróficos matan a la célula hospedera antes o después de la invasión, al excretar sustancias tóxicas que degradan las paredes celulares

del hongo patógeno, y posteriormente utilizan los nutrientes liberados de la célula muerta; son capaces de existir indefinidamente como saprofitos y se caracterizan por su crecimiento rápido sobre una gran variedad de sustratos, tienden a ser más agresivos y presentan un amplio rango de hospedantes extendidos a lo largo de todos los grupos taxonómicos y no son especializados en su modo de parasitismo (Manocha, 1991). Su actividad antagónica es atribuida a la producción de antibióticos, toxinas o enzimas hidrolíticas en proporciones que causan la muerte y destrucción de su hospedero (Inbar y Chet, 1997).

3.5.1.2 Antibiosis

Se refiere a la producción por parte de un microorganismo de sustancias tóxicas para otros microorganismos, las cuales actúan en bajas concentraciones (menores a 10 ppm.). La antibiosis es el mecanismo de antagonismo entre microorganismos más estudiado.

Es deseable que la antibiosis no sea el principal mecanismo de acción de un antagonista. Esto se debe a que, al igual que cuando se usan fungicidas sintéticos, existe el riesgo de aparición de cepas del patógeno resistentes al antibiótico (Campbell, 1989).

En 1965, Jackson define a la antibiosis, como la condición por la cual un organismo excreta uno o más metabolitos capaces de tener efectos dañinos sobre otro o más organismos; al respecto, Handelsman y Parke (1989),

restringen la definición sólo a aquellas interacciones que involucran compuestos difusibles de bajo peso molecular o antibióticos producidos por un microorganismo que inhiben el desarrollo del otro, esta definición excluye a proteínas y enzimas que matan al organismo; más tarde Baker y Griffin (1995), extienden el alcance de esta definición a "inhibición o destrucción de un organismo por la producción metabólica de otro", que incluye enzimas hidrolíticas, metabolitos secundarios volátiles y pequeñas moléculas tóxicas.

Un género muy ampliamente estudiado es *Trichoderma*, pero la habilidad de las cepas de *Trichoderma* para producir metabolitos es muy variada entre las diferentes especies, aún entre cepas de la misma especie; además, una cepa en particular puede producir diferentes metabolitos a diferentes estados de desarrollo según las condiciones de cultivo (Cooney *et al.*, 1997; Cooney y Lauren, 1999).

3.6 Metabolitos primarios y secundarios

El metabolismo es el conjunto de reacciones químicas que realizan las células de los seres vivos para sintetizar sustancias complejas a partir de otras más simples, o para degradar las complejas y obtener las simples.

El conjunto de reacciones químicas que tienen lugar en un organismo constituye el metabolismo. La mayor parte del carbono, del nitrógeno y de la energía termina en moléculas comunes a todas las células, necesarias para su funcionamiento y el de los organismos. Se trata de aminoácidos,

nucleótidos, azúcares y lípidos, presentes en todas las plantas y desempeñando las mismas funciones. Se denominan metabolitos primarios, son moléculas de bajo peso molecular que intervienen, bien como productos finales o intermediarios, en las distintas rutas anabólicas y catabólicas, son necesarios para el crecimiento del microorganismo que los produce, se producen como productos únicos, son producidos por todos los microorganismos (son universales), la producción no puede perderse fácilmente por mutación espontánea.

Las plantas, organismos autótrofos, además del metabolismo primario presente en todos los seres vivos, poseen un metabolismo secundario que les permite producir y acumular compuestos de naturaleza química diversa. Estos compuestos derivados del metabolismo secundario se denominan metabolitos secundarios, se distribuyen diferencialmente entre grupos taxonómicos, presentan propiedades biológicas, muchos desempeñan funciones ecológicas y se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes o colorantes, entre otros. Reciben también la denominación de productos naturales, se producen cuando la velocidad de crecimiento es baja, no tienen pues una función esencial en el crecimiento, entre ellos tenemos: antibióticos, toxinas, alcaloides, pigmentos. Generalmente se producen como mezclas de productos muy relacionados químicamente entre sí, la producción puede perderse fácilmente por mutación espontánea, cada uno

de estos productos es producido por un grupo muy reducido de organismos (Avalos y Perez-Urria, 2009).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Ubicación del experimento

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el laboratorio de Fitopatología de la estación experimental "Juan Bernito", del Instituto de Cultivos Tropicales (ICT), ubicado en el distrito de la Banda de Shilcayo, provincia y departamento de San Martín; que se encuentra a una latitud sur 06° 00' 28", latitud oeste 76° 00' 18" y a una altitud de 315 msnm (Figura 1).

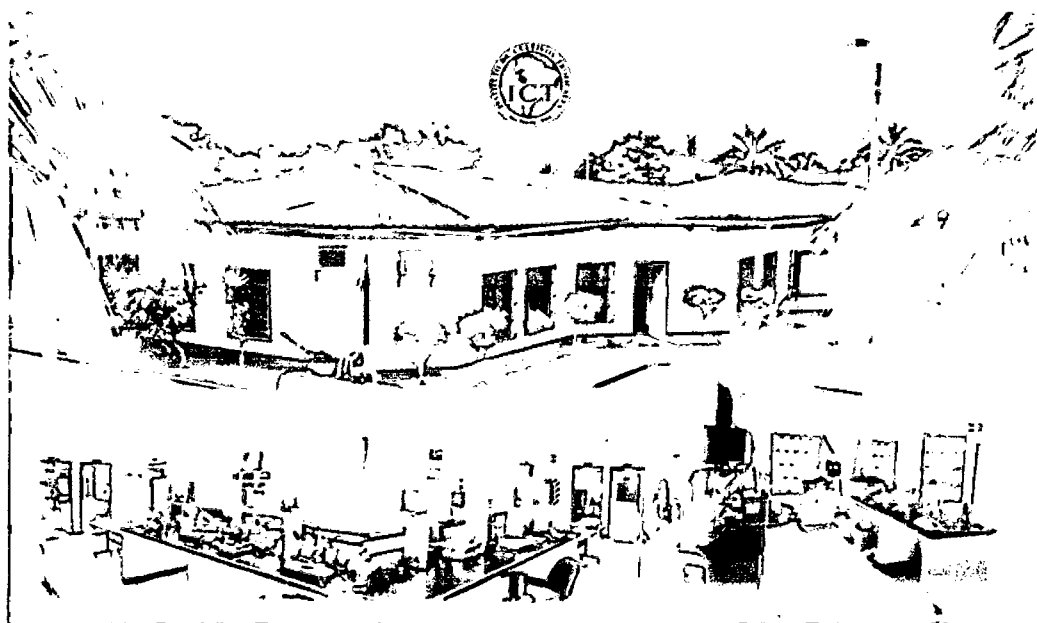


Figura 1: Laboratorio de Fitopatología ubicado en la Estación Experimental "Juan Bernito" – ICT.

4.2 Origen de los hongos endófitos en estudio

El Instituto de Cultivos Tropicales (ICT) realizó tres expediciones por el Alto Amazonas entre los años 2008 y 2009 (Figura 2), se ubicaron plantas de cacao en estado silvestre, con la finalidad de obtener material genético (varas yemeras), muestras de suelo y además se colectaron cerca de 1600 aislamientos de hongos endófitos a partir de tallos y hojas de las plantas de

cacao. Los hongos endófitos actualmente se encuentran conservados en la micoteca del laboratorio de Fitopatología del ICT, con la finalidad de realizar diferentes trabajos de investigación.

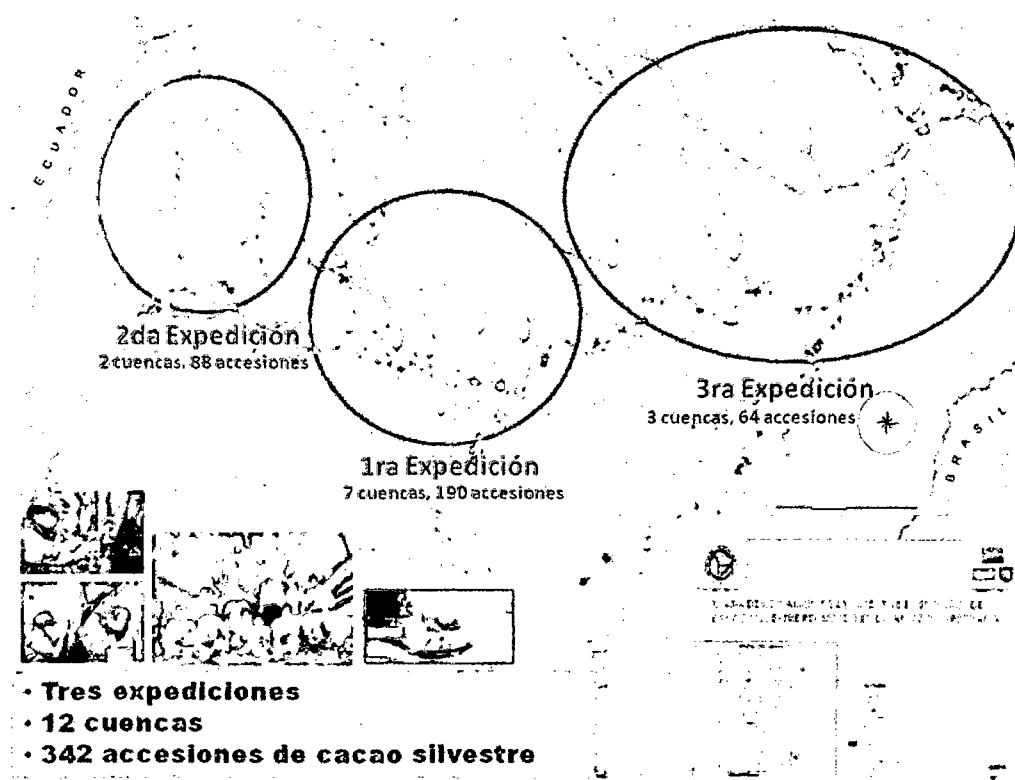


Figura 2: Mapa de las cuencas tributarias del Amazonas y ubicación de las localidades.

4.3 Selección y reactivación de los hongos endófitos

Para este trabajo de investigación se emplearon 46 aislamientos de hongos endófitos pertenecientes a diez géneros. Se seleccionaron al azar cinco aislamientos de diferentes localidades por cada género (*Colletotrichum*, *Pestalotiopsis*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Clonostachys*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Botryosphaeria*) y tres aislamientos para los géneros (*Xylaria* y *Acremonium*) (Cuadro 1). Estos fueron reactivados en placas petri conteniendo medio de cultivo Papa Sacarosa Agar (PSA), e incubaron a temperatura ambiente (25 °C).

Cuadro 1: Origen de aislamientos de hongos endófitos.

Género	Código	Órgano	Localidad
<i>Colletotrichum</i>	Coll-E -11	Hoja	Urituyacu
	Coll-E -23	Tallo	Ungumayo
	Coll-E - 28	Hoja	Aypena
	Coll-E-73	Hoja	Chambira
	Coll-E-79	Hoja	Tigre
<i>Pestalotiopsis</i>	P-E -71	Hoja	Charupa
	P-E -168	Tallo	Urituyacu
	P-E -251	Hoja	Santiago
	P-E -352	Hoja	Tigre
<i>Aspergillus</i>	As-E-1	Tallo	Aypena
	As-E-2	Tallo	Aypena
	As-E-3	Tallo	Pastaza
	As-E-4	Tallo	Pastaza
	As-E-5	Tallo	Pastaza
	As-E-6	Hoja	Nucuray
<i>Penicillium</i>	Pen-E-1	Tallo	Aypena
	Pen-E-4	Tallo	Ungurahui
	Pen-E-6	Tallo	Pastaza
	Pen-E-8	Tallo	Ungumayo
	Pen-E-10	Tallo	Nucuray
<i>Clonostachys</i>	Cl-E-43	Tallo	Ungumayo
	Cl-E-55	Tallo	Aypena
	Cl-E-109	Hoja	Charupa
	Cl-E-119	Tallo	Morona
	Cl-E-123	Tallo	Santiago
<i>Trichoderma</i>	T-E- 5	Tallo	Aypena
	T-E - 17	Tallo	Pastaza
	T-E- 50	Tallo	Urituyacu
	T-E-166	Tallo	Napo
	T-E-175	Tallo	Tigre
<i>Fusarium</i>	F-E-38	Tallo	Ungumayo
	F-E-85	Tallo	Urituyacu
	F-E-182	Hoja	Santiago
	F-E-187	Tallo	Santiago
	F-E-195	Hoja	Tigre
<i>Botryosphaeria</i>	Bo-E-72	Hoja	Urituyacu
	Bo-E-107	Hoja	Santiago
	Bo-E-131	Hoja	Morona
	Bo-E-184	Hoja	Tigre
	Bo-E-199	Hoja	Napo
<i>Xylaria</i>	X-E-32	Hoja	Ungumayo
	X-E-55	Rama	Aypena
	X-E-76	Rama	Santiago
<i>Acremonium</i>	Acr-E-3	Rama	Urituyacu
	Acr-E-4	Rama	Urituyacu
	Acr-E-6	Rama	Urituyacu

4.4 Preparación de medios de cultivo

Para el desarrollo de las diferentes pruebas se prepararon medios de cultivo como: Papa Sacarosa Agar (PSA) con 1,8% y 3,6% de agar, caldo mínimo en sales (MIN) para la producción de metabolitos y medio a base de jugo V-8 clarificado para la producción de zoosporas de *P. palmivora*.

4.5 Pruebas de antagonismo *in vitro*

4.5.1 Prueba de Antibiosis (Metodología de Bailey *et al.*, 2008, modificado).

Para esta prueba se produjo metabolitos solubles inhibitorios de los 46 aislamientos seleccionados. Estos fueron sembrados en placas petri conteniendo PSA e incubados a 25°C para promover la esporulación. A partir de estos cultivos, las conidias fueron cosechadas, agregando agua destilada estéril sobre la superficie de las placas y con una varilla de vidrio estéril se realizó el raspado (Figura 3 A). De la suspensión de esporas se realizaron diluciones seriadas y con la ayuda de un hematocímetro se realizó el conteo de conidias y uniformizó el inóculo a una concentración de 1×10^6 conidias ml^{-1} (Figura 3 E y F), luego se incorporó 1 ml de la suspensión de conidias en tres matraces conteniendo 60 ml de caldo mínimo en sales (MIN), los matraces fueron agitados a 110 rpm durante siete días (Figura 3 G y H). Posteriormente, el micelio fue removido por filtración (Figura 3 I), y el filtrado estéril fue agitado en tubos de centrifuga por 20 minutos, luego se extrajo 25 ml del filtrado estéril y se colocó en baño maría a 90°C por dos horas, después se agregó un volumen igual de PSA (3,6% de agar) y se transfirieron en placas petri de 60 x 15 mm (Figura 3 J, K y L). En el centro

de las placas se inocularon 3mm de medio con micelio de los patógenos *P. palmivora* y *M. royeri* de una edad de crecimiento de siete y diez días respectivamente (Figura 3 M), se realizó tres repeticiones por filtrado y las placas fueron incubadas a temperatura de ambiente (25°C aproximadamente). Para los controles se preparó solo con el filtrado del correspondiente caldo sin inocular. La inhibición del crecimiento micelial de *P. palmivora* y *M. royeri*, se registró como la diferencia entre la media del crecimiento radial en la presencia y ausencia del filtrado fungal.

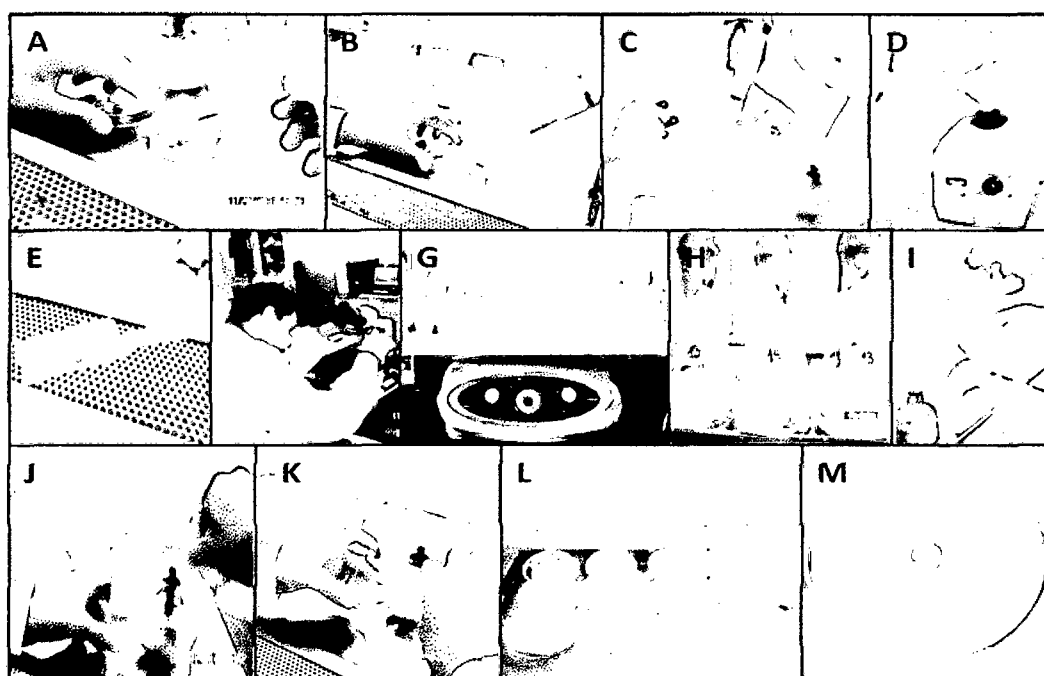


Figura 3: Prueba de antibiosis: raspado de placas con ADE y una varilla (A), extracción de la suspensión de conidias y mezcla con ADE en tubos de ensayo (B y C), agitación de los tubos para desprender las conidias (D), conteo de conidias utilizando un hematocímetro y el microscopio (E y F), inoculación en matraces con caldo min e incubación en agitación (G), cosecha de metabolitos de los aislamientos (H e I), mezcla de metabolitos con PSA al 36% de Agar (J), plaqueo respectivo (K y L), siembra de los patógenos en placa de 60 X 15 mm con medio PSA + metabolitos (M).

4.5.2 Prueba de Micoparasitismo. (Metodología utilizada por Bailey, 2008, modificado).

Se utilizó el método de placa pre-colonizada; de cada uno de los aislamientos de hongos endófitos, se extrajo un trozo de 2,5 x 0,5cm de inóculo de una colonia joven y fue localizado en una placa petri (9 cm de diámetro) conteniendo medio PSA, pre-colonizado por los patógenos (*P. palmivora* y *M. royeri*) (Figura 4 A). Por cada aislamiento de hongo endófito se realizó tres repeticiones (placas petri).

Al cabo de dos semanas de incubación a 25°C en oscuridad, con la ayuda de un sacabocado de 3mm de diámetro se extrajo diez muestras de cada réplica cerca al punto de inóculo del patógeno (Figura 4 B) y fueron localizados en placas conteniendo medio PSA e incubados a 25°C en oscuridad y se observó el crecimiento del hongo endófito o el patógeno (Figura 4 C), y se determinó el porcentaje de colonización del hongo endófito.

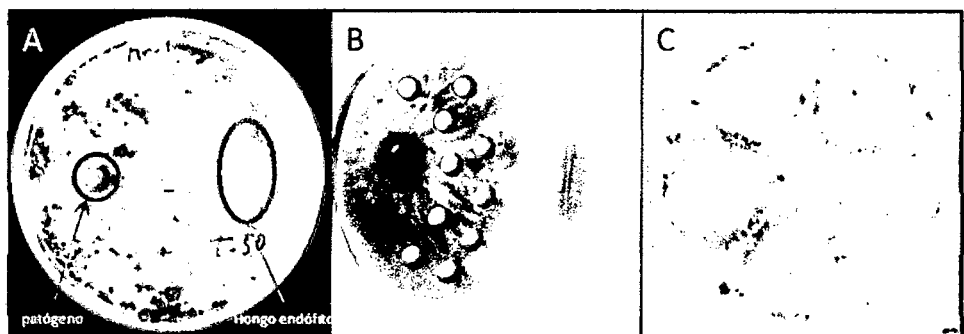


Figura 4: Prueba de micoparasitismo, A=colocación del biocontrolador en placas precolonizadas por el patógeno, B=extracción de discos de las placas precolonizadas y C=reaislamiento en placas conteniendo PSA.

4.6 Evaluación de la eficiencia de hongos endófitos en el control de *M. roreri* Y *P. palmiovora* en hojas y frutos de cacao *in vitro*

Para evaluar la eficiencia de los hongos endófitos con potencial de biocontrol a *M. roreri* y *P. palmiovora* en hojas y frutos de cacao se empleó técnicas sencillas y rápidas *in vitro*. Para estas pruebas se emplearon hongos endófitos que fueron previamente seleccionados por su capacidad antagónica *in vitro* correspondientes a las pruebas de micoparasitismo y antibiosis de los patógenos.

Cuadro 2: Hongos endófitos con potencial de biocontrol a *P. palmiovora* y *M. roreri*.

Genero	Aislamiento	Patógenos
<i>Acremonium</i>	Acr-E-6	<i>M. roreri</i>
	Acr-E-3	<i>P. palmiovora</i>
<i>Aspergillus</i>	As-E-3	<i>M. roreri</i> , y <i>P. palmiovora</i>
<i>Botryosphaeria</i>	Bo-E-199	<i>M. roreri</i> , y <i>P. palmiovora</i>
<i>Clonostachys</i>	Cl-E-119	<i>M. roreri</i> y <i>P. palmiovora</i>
	Cl-E-109	<i>P. palmiovora</i>
<i>Colletotrichum</i>	Coll-E-28	<i>M. roreri</i> , y <i>P. palmiovora</i>
	Coll-E-11	<i>P. palmiovora</i>
<i>Fusarium</i>	F-E-85	<i>M. roreri</i> , y <i>P. palmiovora</i>
<i>Pestalotiopsis</i>	P-E-168	<i>M. roreri</i> , y <i>P. palmiovora</i>
	P-E-71	<i>P. palmiovora</i>
<i>Penicillium</i>	Pen-E-8	<i>M. roreri</i> , y <i>P. palmiovora</i> ,
<i>Trichoderma</i>	T-E-17	<i>M. roreri</i> , y <i>P. palmiovora</i>
	T-E-5	<i>M. roreri</i> y <i>P. palmiovora</i>
	T-E-50	<i>M. roreri</i>
	T-E-166	<i>M. roreri</i>
	T-E-175	<i>M. roreri</i>
<i>Xylaria</i>	X-E-55	<i>M. roreri</i>
	X-E-32	<i>P. palmiovora</i>

4.6.1 Eficiencia de hongos endófitos en la inhibición de la esporulación de *Moniliophthora roreri* en cilindros de frutos de cacao

Para determinar la eficiencia de hongos endófitos en la inhibición de la esporulación de *Moniliophthora roreri* en cilindros de frutos de cacao, se empleó suspensión de conidias y metabolitos secundarios de aquellos endófitos que fueron seleccionados por su capacidad de micoparasitar e inhibir el crecimiento micelial de *M. roreri* in vitro respectivamente.

4.6.1.1 Metabolitos secundarios de hongos endófitos

Se seleccionaron diez aislamientos (Pen-E-8, P-E-168, Coll-E-28, F-E-85, As-E-3, T-E-17, Cl-E-119, Acr-E-6, X-E-55, Bo-E-199) de la prueba de antibiosis, (para la producción de metabolitos se utilizó la metodología descrita por Bailey *et al.*, 2008, modificado), descrito en el punto 4.5.1; luego se extrajo 40 ml del filtrado estéril y se colocó en baño maría a 90°C por dos horas, se agregó un volumen igual de Agua Destilada Estéril (ADE), esto con la finalidad de bajar la concentración de metabolitos, obteniendo un volumen total de 80ml de metabolitos secundarios por cada aislamiento al 50% de concentración (figura 5H).

Así mismo se colectó frutos con síntomas de la enfermedad de Moniliasis (Figura 5 A), de las parcelas de cacao de la estación “El Choclino”, estos fueron llevados al laboratorio, luego fueron desinfestados con hipoclorito de sodio al 2% y enjuagados tres veces con ADE (Figura 5 B y C), luego se dejó secar en la cámara de siembra para después realizar cortes en forma

de rodajas de 1 cm de espesor (Figura 5 D y E), de cada rodaja se obtuvo cilindros de tejido infectado con la ayuda de un sacabocado de 9mm de diámetro (Figura 5 F). Se empleó tres frutos (repeticiones), de donde se obtuvo 70 cilindros de cada fruto, se sumergió diez cilindros en los metabolitos inhibidores de cada aislamiento por cinco minutos (Figura 5 G), pasado el tiempo se transfirió los cilindros a placas petri y se dejó incubar a temperatura ambiente por 48, 96 y 144 horas bajo luz (Figura 5 I), para las evaluaciones se extrajeron tres cilindros de cada placa y fueron colocados cada uno en un tubo de ensayo conteniendo 10 ml de ADE + twin 80 (Figura 5 J y K), con la ayuda del Bortex se desprendieron las conidias de *M. roreri* y estos fueron contados con la ayuda de un hematocímetro, se evaluó el número de conidias de *M. roreri* por cilindro (tres cilindros cada evaluación por cada tratamiento) (Figura 5 L).

4.6.1.2 Suspensión de conidias de hongos endófitos

Cinco aislamientos del género *Trichoderma* (T-E-5, T-E-17, T-E-50, T-E-166 y T-E-75) que tuvieron mayor capacidad de micoparasitar a *M. roreri*, procedentes de la prueba de micoparasitismo, fueron sembrados en placas petri conteniendo PSA. Después de tres días se añadió 5 ml de ADE sobre cada placa, se procedió al raspado y se preparó una suspensión de conidias a una concentración de 1×10^7 conidias/ cc, en un volumen de 80 ml contenidos en un vaso precipitado por cada aislamiento. La obtención de cilindros de frutos infectados con *M. roreri* se hizo bajo el procedimiento descrito en el punto anterior (4.6.1.1).

Para las evaluaciones se procedió bajo la misma metodología descrito anteriormente a las 48, 96 y 144 horas de haber colocado los cilindros en los vasos precipitados conteniendo suspensión de conidias de hongos endófitos.

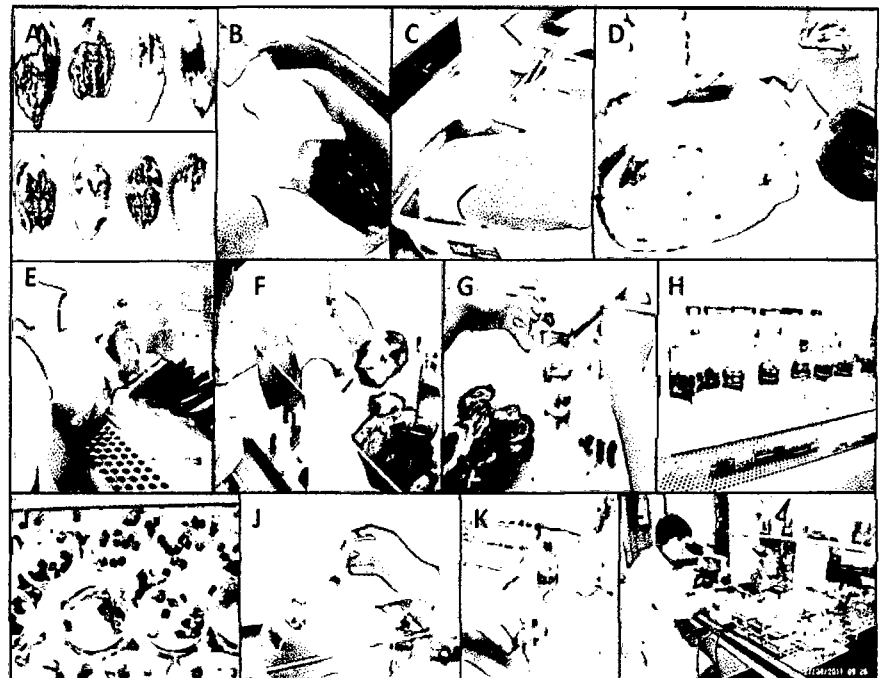


Figura 5: Método de inhibición de conidias de *M. roreri* en cilindros de cáscara de cacao infectado con la enfermedad, frutos infectados (A), lavado y enjuagado de los frutos (B y C), secado de frutos en la cámara de siembra (D), corte en rodajas (E), corte del tejido infectado en cilindros (F), colocación de los cilindros en vaso precipitado conteniendo suspensión de conidias o metabolitos de hongos endófitos (G y H), incubación de las placas bajo luz (I), extracción de los cilindros de las placas y colocados en tubos de ensayo conteniendo 10 ml de ADE (J y K), conteo de conidias de *M. roreri* de los tubos de ensayo (L).

4.6.2. Eficiencia de hongos endófitos en el control de *P. palmivora* mediante la técnica de discos de hojas

Para determinar la eficiencia de hongos endófitos en el control de *P. palmivora* mediante la técnica de discos de hojas, se empleó suspensión de conidias y metabolitos secundarios de aquellos endófitos que fueron seleccionados por su capacidad de micoparasitar e inhibir el crecimiento micelial de *P. palmivora* in vitro respectivamente.

4.6.2.1 Metabolitos secundarios de hongos endófitos

De la prueba de antibiosis se seleccionaron diez aislamientos (Acr-E-3, X-E-32, Coll-E-28, P-E-71, Bo-E-199, As-E-3, Pen-E-8, F-E-85, T-E-17, Cl-E-109), estos tuvieron mayor capacidad de inhibir el crecimiento micelial de *P. palmivora*.

En esta prueba se realizó la producción de zoosporas mediante el método descrito por Widner and Laurent (2006), modificado; se sembró *P. palmivora* en placas petri conteniendo medio preparado a base de jugo V-8 clarificado por cuatro días en oscuridad, luego se removió el micelio del medio V-8 y se enjuagó por tres veces con ADE, y se transfirió en una placa, después del raspado sobre cada placa se agregó 10 ml de ADE y se colocó bajo luz durante siete días, transcurrido el tiempo se adicionó 20 ml de ADE sobre cada placa, finalmente se colocó las placas a 4°C de temperatura durante 30 minutos, finalmente se ajustó la suspensión de zoosporas a una concentración de 3×10^5 zoosporas cc^{-1} , la cuantificación del inóculo se realizó el mismo día de recolección de hojas para la inoculación.

La recolección de las hojas se realizó el día de inoculación de metabolitos/zoosporas, estas fueron traídas de las parcelas de la estación “El Choclino” propiedad del ICT, así mismo estas tenían una edad entre 2-3 meses (Figura 7 A), se escogió al azar tres plantas del clon IMC-67, luego de cada planta se escogió tres ramas y así mismo de cada rama se cogieron diez hojas que sirvieron para realizar los discos, las hojas fueron llevadas al

laboratorio, se procedió a lavar dos veces con agua destilada y luego se colocó en la cámara de flujo laminar para su secado respectivo, posteriormente se procedió al corte de los discos con la ayuda de un sacabocado de 12 mm de diámetro (Figura 7 B y C), se colocaron los discos sobre almohadillas humedecidas con ADE en un taper de 35 cm de largo, 24 cm de ancho y 12 cm de alto, (para crear un ambiente húmedo evitando que los discos de hojas no se marchiten) (Figura 7 D).

Los metabolitos secundarios fueron producidos mediante el método descrito por Bailey *et al.*, 2008, modificado, estos fueron producidos con anterioridad y conservados hasta el día de la instalación del experimento. El día de la instalación del trabajo los metabolitos fueron colocados en baño María durante dos horas y se agregó un volumen igual para bajar la concentración al 50% (Figura 7 F), luego se procedió a inocular 25 microlitros de metabolitos a cada disco (Figura 7 G), posteriormente se inóculo las zoosporas, con un volumen de 25 ul (Figura 7 H), se procedió a cerrar los tapers y se colocaron en oscuridad por cinco días (Figura 7 I).

Las evaluaciones de severidad de la enfermedad se realizaron a los tres y cinco días después de la inoculación utilizando una escala de 0-5 para el tamaño e intensidad de síntomas propuesta por Nyasse' *et al.*, (1995); Donde, DS0= ausencia de síntomas, DS1= Manchas necróticas muy pequeñas, DS2= mayor número y tamaño de manchas marrones o necróticas, DS3= coalescencia de las manchas marrones dentro del tamaño

de las lesiones de la gota de inóculo, DS4= lesiones marrones uniformemente grandes, DS5 = lesiones marrones muy grandes, frecuentemente se expande fuera del área cubierta por la gota de inoculación (Figura 6).

4.6.2.2 Suspensión de conidias de hongos endófitos

De la prueba de micoparasitismo se seleccionaron siete aislamientos (P-E-168, P-E-71, CI-E-119, Coll-E-11, Pen-E-8, T-E-5, As-E-3), por tener mayor capacidad de micoparasitar al patógeno.

Los aislamientos seleccionados fueron sembrados en medio PSA e incubados durante diez días bajo luz para la producción de conidias. A partir de estos cultivos se realizó un raspado agregando agua destilada estéril sobre la superficie de las placas y agitándolas con una varilla de vidrio estéril, con la finalidad de obtener una suspensión de conidias a una concentración a 1×10^7 conidias cc (Figura 7 E).

Con la ayuda de un micropipetor se inoculó, en los discos de hoja, la suspensión de conidias de los aislamientos seleccionados un volumen de 25 microlitros por disco (Figura 7 G), posteriormente se inóculo las zoosporas a una concentración de 3×10^5 zoosporas cc con un volumen de 25 microlitros (la producción de zoosporas fue descrita en el punto 4.6.2.1), (Figura 7 H), luego se procedió a cerrar los tapers y se colocó en oscuridad durante cinco días (Figura 7 I), las evaluaciones se realizaron a los tres y cinco días de inoculación (ddi).

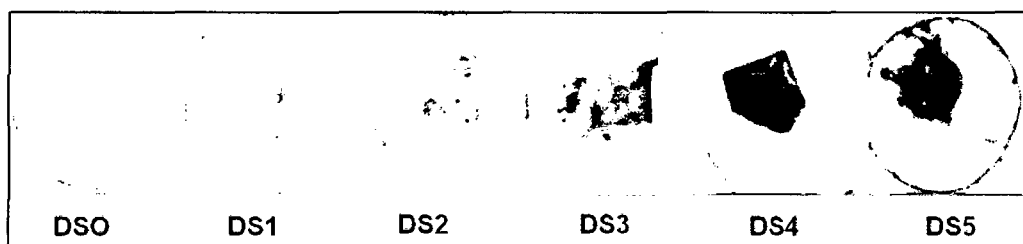


Figura 6: Escala de evaluación según el tamaño e intensidad de síntomas (Nyasse' et al., 1995).

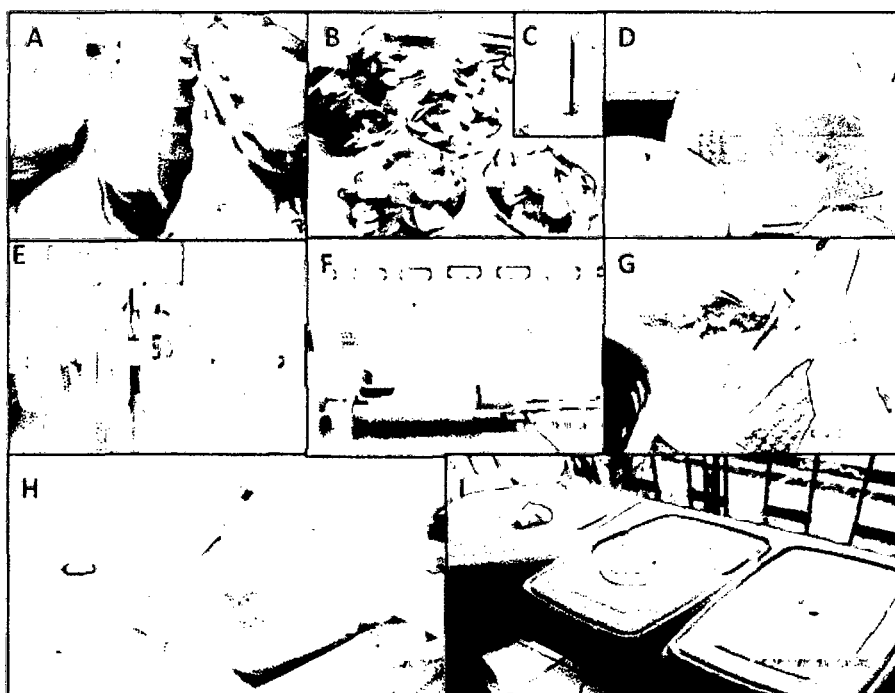


Figura 7: prueba de infección de *P. palmivora* en discos de hojas: secado de hojas de cacao IMC-67 (A), corte de discos con sacabocado (B y C), colocación de discos en taper (D), suspensión de conidias de hongos endófitos (E), metabolitos secundarios de hongos endófitos (F), inoculación de suspensión de conidias o metabolitos secundarios (G), inoculación de zoosporas en discos de hojas (H), cerrado de los tapers y colocados en oscuridad (I).

4.7 Parámetros de evaluación

4.7.1 Porcentaje de Inhibición micelial de los patógenos

Se tomó medidas del crecimiento radial de la colonia (cm) de los patógenos en medio PSA para los controles y en medio PSA + metabolitos de los hongos endófitos, cuando los patógenos han colonizado completamente las placas de los controles. El porcentaje de inhibición fue determinado por el

promedio de la diferencia de la media del control (**C**) con la media del biocontrolador (**B**) con respecto al control (**C**) con la siguiente fórmula

(Sivakumar *et al.*, 2000):
$$\%I = \frac{C-B}{C} \times 100$$

4.7.2 Porcentaje de micoparasitismo de los hongos endófitos hacia los patógenos

Se determinó el micoparasitismo de los hongos endófitos hacia los patógenos con la ayuda de un estereomicroscopio, donde se observó el crecimiento del patógeno o del hongo endófito de los discos extraídos del reaislamiento de las placas precolonizadas por los patógenos. De los, 30 discos reaislados por tratamientos, se contabilizó el número de discos de acuerdo al parámetro de evaluación: Micoparasitó (+), si creció solo el hongo endófito, y micoparasitó (-), si creció el patógeno o ambos.

4.7.3 Porcentaje de inhibición de conidias de *M. royeri*

Se cuantificó el número de conidias de *M. royeri* con la ayuda de un hematócmetro y el microscopio, de cada uno de los tubos de ensayo conteniendo un cilindro del tejido de cacao infectado, anteriormente inoculado con suspensión y metabolitos de hongos endófitos. El porcentaje de inhibición de conidias fue determinado por el promedio de la diferencia de la media del control (**C**) con la media del biocontrolador (**B**) con respecto al control (**C**) con la siguiente fórmula (Sivakumar *et al.*, 2000):

$$\%I = \frac{C-B}{C} \times 100$$

4.7.4 Grado de severidad de la pudrición parda en discos de hoja de cacao

Para determinar el grado de severidad de la enfermedad se procedió a tomar fotos a los discos con la ayuda de una cámara digital a los tres y cinco días después de la inoculación (ddi). Para realizar las lecturas del grado de severidad se utilizó una escala de 0-5 propuesta por Nyasse' *et al.*, (1995).

4.8 Análisis estadístico de los datos

Para las pruebas de capacidad antagónica de hongos endófitos (Antibiosis y Micoparasitismo) para el control de *M. roreri* y *P. palmivora*, se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA); para lo cual se seleccionaron cinco aislamientos de cada género a excepción de los géneros *Xylaria* y *Acremonium* que se seleccionó tres aislamientos, haciendo un total de 46 aislamientos que representan a los tratamientos y cada uno de ellos con tres repeticiones; el porcentaje de inhibición micelial se tuvo que expresar en grados, para tal propósito se extrajo el arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción del porcentaje de inhibición, multiplicada por $180/\pi$, luego se analizaron utilizando el programa InfoStat/Profesional versión 1.1, realizando los análisis de varianza (ANVA), prueba de Duncan, a un nivel de significancia de 0,05.

Para las pruebas de eficiencia de hongos endófitos para el control de *M. roreri* y *P. palmivora* se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) con sub unidades, para lo cual se determinó el porcentaje de inhibición de conidias (*M. roreri*) y grado de severidad (*P. palmivora*), luego se analizaron

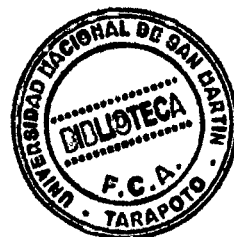
utilizando el programa SAS System release 6.12, realizando los análisis de varianza (ANVA), prueba de Duncan, a un nivel de significancia de 0,05, utilizando un modelo aditivo lineal:

$$X_{ijk} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij} + \delta_{ijk}$$

ANALISIS DE VARIANCIA:

FUENTE DE VARIACION	SC
Total de unidades	tr-1
Entre tratamientos	t-1
Unidades dentro de tratamientos=Error experimental.	t(r-1)
Entre Sub unidades dentro de unidades=Error de muestreo	tr(s-1)
Total entre Sub unidades	trs -1

V. RESULTADOS



5.1 Capacidad antagónica de hongos endófitos hacia *P. palmivora* y *M. roreri*.

5.1.1 Antibiosis de hongos endófitos hacia *M. roreri* y *P. palmivora*.

Según el análisis de varianza (cuadro 3) del porcentaje de inhibición micelial de *M. roreri* en presencia de los metabolitos inhibitorios de hongos endófitos, indica que existen diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0,05$) con un coeficiente de variabilidad de 12,22 y coeficiente de determinación de 0,96 %.

En la figura 8 y anexo 1 se observa el efecto de los metabolitos secundarios de 46 aislamientos de hongos endófitos en la inhibición micelial de *M. roreri* y se encontró que existen diferencias significativas entre los aislamientos de cada género. Los metabolitos obtenidos del género *Aspergillus* tuvieron mayor efecto sobre *M. roreri* con valores entre 17,5% a 95,13% de inhibición micelial, seguido de *Botryosphaeria* (11,08% a 65,42%), *Penicillium* (8,07% a 43,1%), *Trichoderma* (1,7% a 55,63%), *Pestalotiopsis* (9,52% a 29,34%), *Clonostachys* (8,93% a 24,45%), *Fusarium* (8,91% a 27,65%), *Acremonium* (11,9% a 20,45%) y *Colletotrichum* (8,94 a 16,49%) a comparación de *Xylaria* (8,66% a 9,59%) tuvo menor efecto en la inhibición micelial del patógeno.

Del total de aislamientos estudiados, los metabolitos secundarios obtenidos del aislamiento As-E-3 obtuvieron el valor más alto con 95,13% en la

inhibición micelial del patógeno, seguidos de Bo-E-199, As-E-6 y T-E- 175 que obtuvieron valores de 65,42%; 62,11% y 55,63% respectivamente; así mismo, los metabolitos de T-E-17, As-E-1, Pen-E-8 y Pen-E-1 mostraron valores considerables entre 42,97% a 47,09%. Sin embargo, los aislamientos T-E-5, T-E-50 y T-E-166 tuvieron menor efecto hacia el patógeno con 1,7%, 2,86 y 3,36% de inhibición micelial respectivamente.

En la figura 9, se observa claramente que la presencia de metabolitos secundarios de diferentes aislamientos de hongos endófitos en medio PSA tuvieron efecto en la inhibición micelial de *M. roreri* a comparación del control (sin metabolitos); sin embargo, mayor efecto tuvieron As-E-3 y Bo-E-199 a comparación del resto de aislamientos estudiados.

Cuadro 3: Análisis de la Varianza (SC tipo III) de porcentaje de inhibición micelial de *M. roreri* en presencia de los metabolitos inhibitorios de Hongos endófitos.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	23410,81	45	520,24	46,13	<0.0001**
Tratamientos	23410,81	45	520,24	46,13	<0.0001**
Error	1037,57	92	11,28		
Total	24448,37	137			

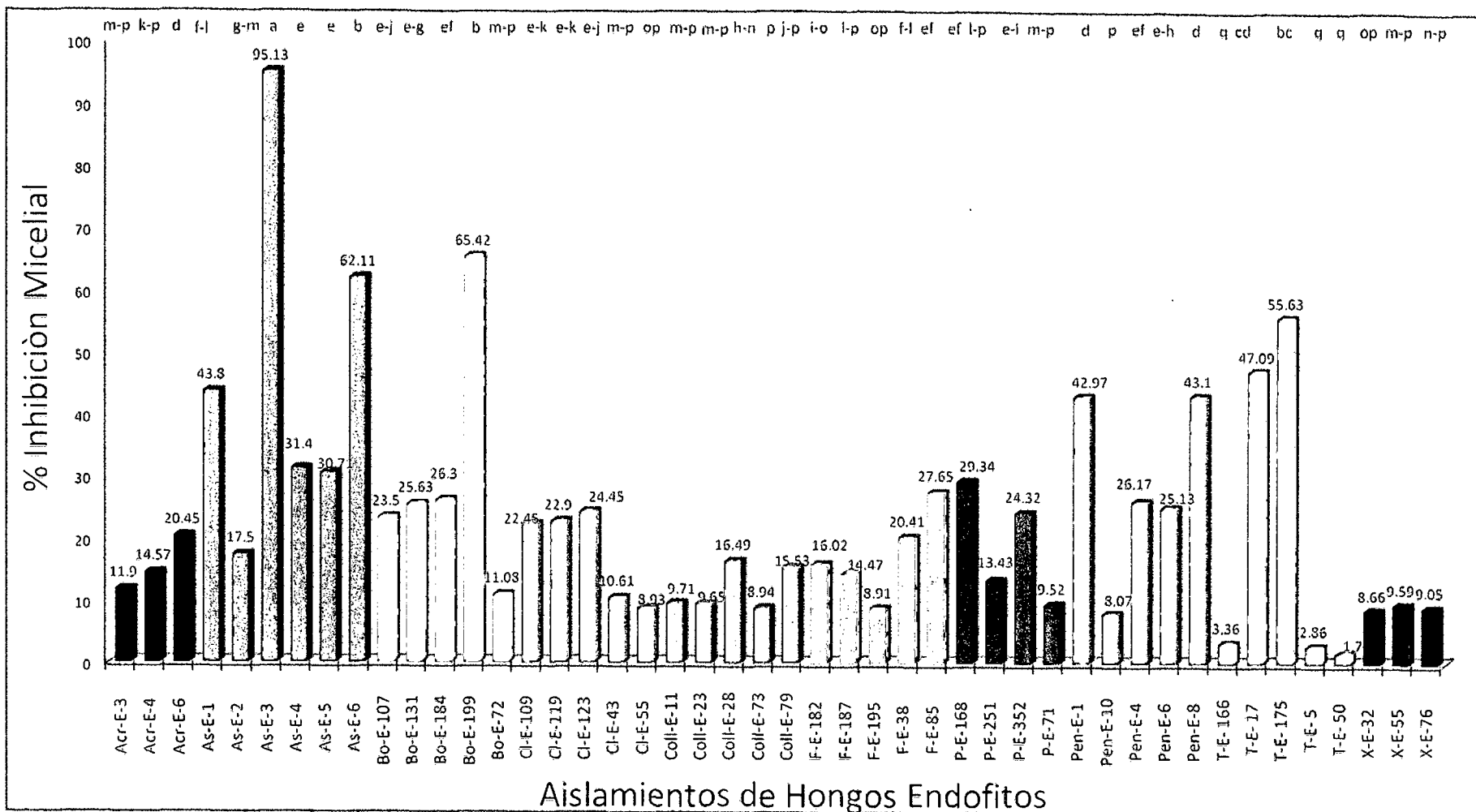


Figura 8: Porcentaje de inhibición micelial de *M. royeri* en presencia metabolitos inhibitorios de Hongos endófito: *Acremonium* (Acr-E), *Aspergillus* (As-E), *Botryosphaeria* (Bo-E), *Clonostachys* (Cl-E), *Colletotrichum* (Coll-E), *Fusarium* (F-E), *Pestalotiopsis* (P-E), *Penicillium* (Pen-E), *Trichoderma* (T-E), *Xylaria* (X-E).

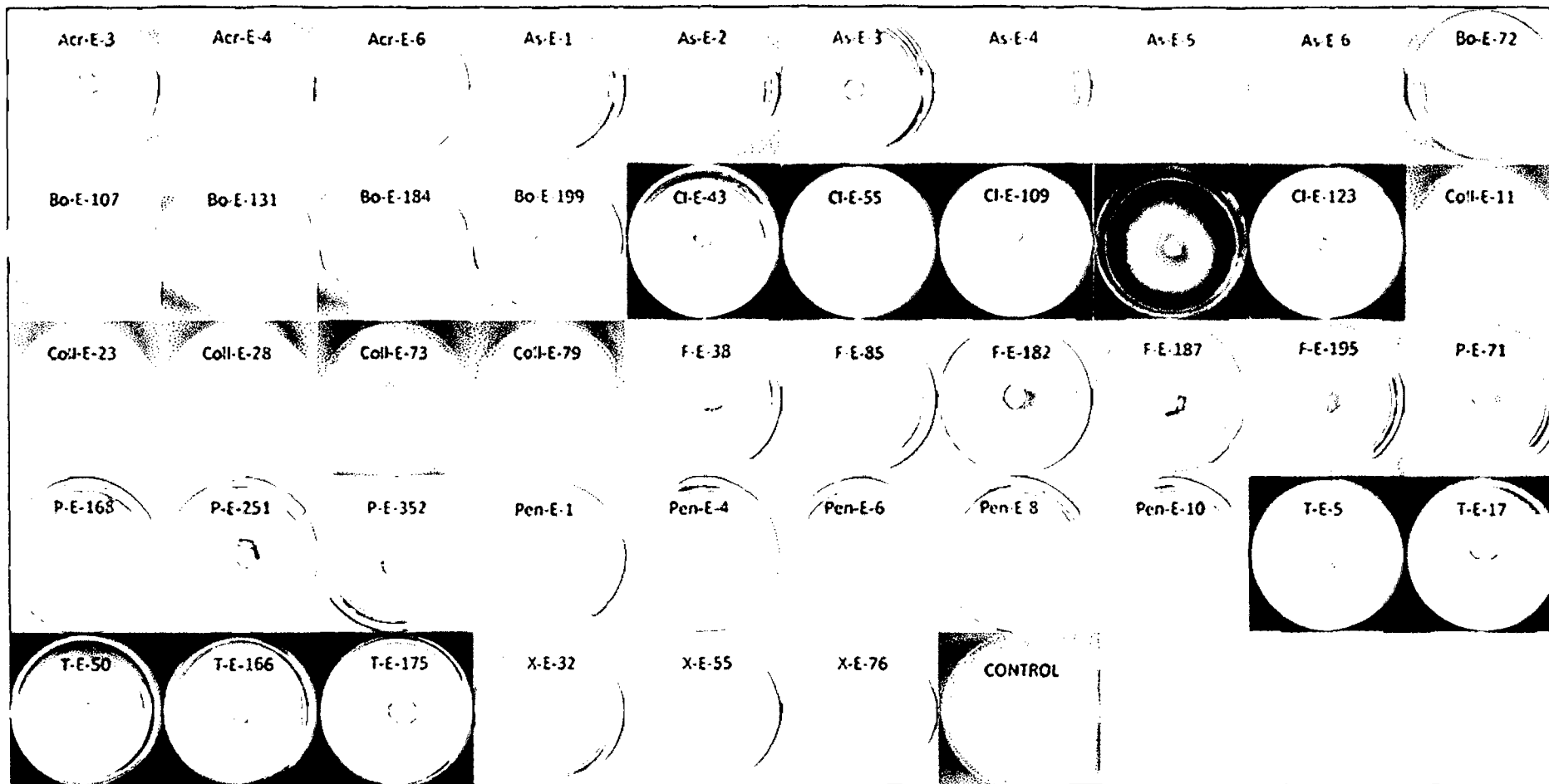


Figura 9: Comportamiento del crecimiento micelial de *M. roreni* en presencia de metabolitos inhibidores de los aislamientos de diez géneros de hongos endófitos : *Acremonium* (Acr-E), *Aspergillus* (As-E), *Botryosphaeria* (Bo-E), *Clonostachys* (Cl-E), *Colletotrichum* (Coll-E), *Fusarium* (F-E), *Pestalotiopsis* (P-E), *Penicillium* (Pen-E), *Trichoderma* (T-E), *Xylaria* (X-E)

Al realizar el análisis de varianza (Cuadro 4) de la capacidad de inhibición del crecimiento micelial de *P. palmivora* *in vitro*, en presencia de metabolitos de hongos endófitos, se determinó un efecto significativo entre tratamientos ($p \leq 0,05$) con un coeficiente de variabilidad de 10,52 y coeficiente de determinación de 0,98%.

En la figura 10 y anexo 2 se observa el efecto de los metabolitos secundarios de 46 aislamientos de hongos endófitos en la inhibición micelial de *P. palmivora* en la prueba de antibiosis e indican que existen diferencias significativas entre las medias de los tratamientos demostrando así que la capacidad del crecimiento micelial del patógeno sufrió alteración al estar en contacto de los metabolitos secundarios de hongos endófitos, a diferencia del control que no se vio afectado y en este el patógeno *P. palmivora* creció de manera constante sin ninguna alteración (Figura 11). Así mismo, se encontró que existen diferencias significativas entre los aislamientos de cada género. Los metabolitos obtenidos del género *Aspergillus* tuvieron mayor efecto sobre *P. palmivora* con valores entre 27,07% a 100% de inhibición micelial, seguido de *Penicillium* (21,7% a 99,46%), *Pestalotiopsis* (9,58% a 56,48%), *Clonostachys* (2,31% a 50,35%), *Trichoderma* (7,46% a 39,08%), *Botryosphaeria* (2,88% a 56,03%), *Fusarium* (8,08% a 48,36%), *Xylaria* (8,6% a 20,86%), y *Colletotrichum* (2,33 a 20,51%) a comparación de *Acremonium* (3,48% a 6,95%) tuvo menor efecto en la inhibición micelial del patógeno.

Al comparar la capacidad de crecimiento micelial del patógeno *P. palmivora* en presencia de los metabolitos secundarios de 46 aislamientos de hongos endófitos, los aislamientos As-E-3 y Pen-E-6 fueron los que mostraron mayor capacidad para inhibir el crecimiento micelial del patógeno a diferencia de los demás aislamientos, obteniendo valores de 100% y 99,46% respectivamente. Del mismo modo, se puede mencionar que la mayoría de aislamientos tuvieron algún efecto sobre el crecimiento micelial del patógeno, (As-6, As-E-1, As-E-5, As-E-4, Pen-E-8, Pen-E-1 y Pen-E-10) mostrando valores entre 71,53% a 87,57%, además los aislamientos P-E-71, Bo-E-199, Cl-E-109, F-E-85, P-E-352 y T-E-50 obtuvieron valores entre 41% a 57%; sin embargo los aislamientos Cl-E-123, Coll-E-73, Bo-E-184, Bo-E-131 y Acr-E-6 tuvieron menor efecto en la inhibición micelial con valores entre 2,31% a 3,48%.

En la figura 11, se observa claramente que la presencia de metabolitos secundarios de diferentes aislamientos de hongos endófitos en medio PSA tuvieron efecto en la inhibición micelial de *P. palmivora* a comparación del control (sin metabolitos); sin embargo, mayor efecto tuvieron As-E-3 y Pen-E-6 a comparación del resto de aislamientos estudiados.

Cuadro 4: Análisis de la Varianza (SC tipo III) de inhibición micelial de *P. palmivora* en presencia de los metabolitos inhibitorios de Hongos endófitos.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	64591,22	45	1435,36	120,22	<0.0001
aislamiento	64591,22	45	1435,36	120,22	<0.0001
Error	1098,41	92	11,94		
Total	65689,63	137			

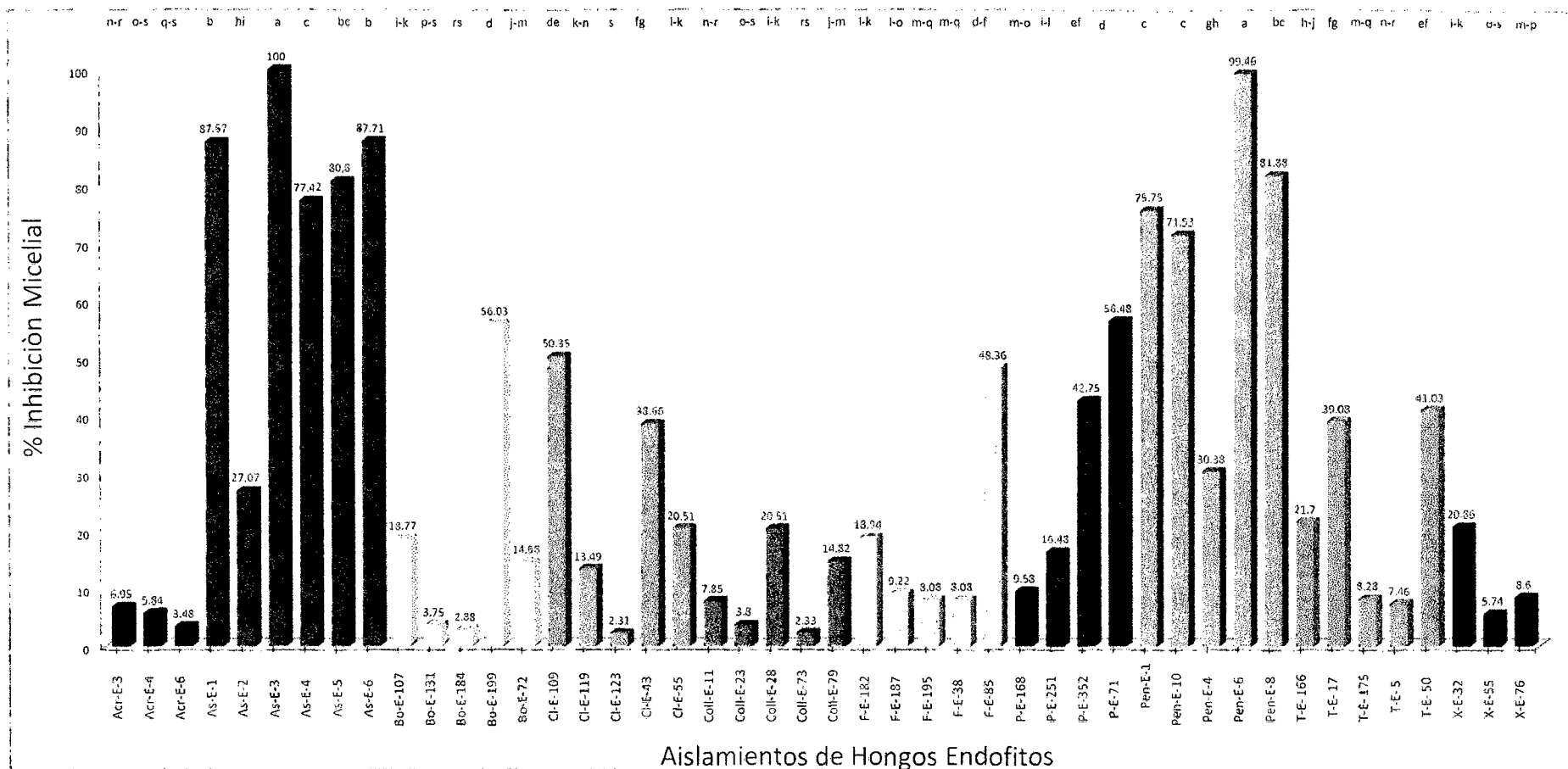


Figura 10: Porcentaje de inhibición micelial de *P. palmivora* en presencia de metabolitos secundarios de aislamientos de hongos endófitos: *Acremonium* (Acr-E), *Aspergillus* (As-E), *Botryosphaeria* (Bo-E), *Clonostachys* (Cl-E), *Colletotrichum* (Coll-E), *Fusarium* (F-E), *Pestalotiopsis* (P-E), *Penicillium* (Pen-E), *Trichoderma* (T-E), *Xylaria* (X-E).

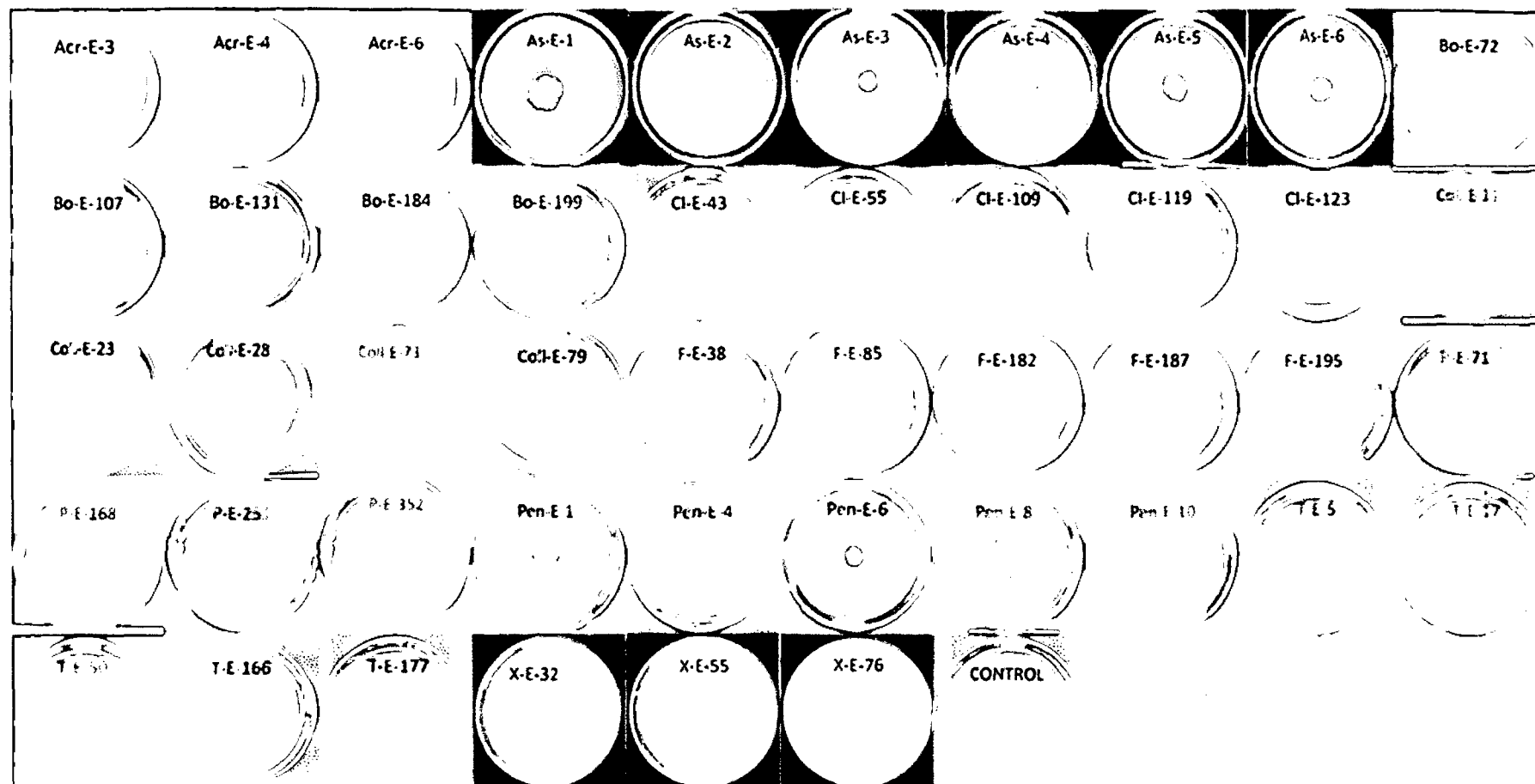


Figura 11: Comportamiento del crecimiento micelial de *P. palmivora* en presencia de metabolitos secundarios de los aislamientos de diez géneros de hongos endófitos : *Acremonium* (Acr-E), *Aspergillus* (As-E), *Botryosphaeria* (Bo-E), *Clonostachys* (Cl-E), *Colletotrichum* (Col-E), *Fusarium* (F-E), *Pestalotiopsis* (P-E), *Penicillium* (Pen-E), *Trichoderma* (T-E), *Xylaria* (X-E).

5.1.2 Micoparasitismo de *Moniliophthora roreri* y *P. palmivora* por hongos endófitos

En la prueba de micoparasitismo de *Moniliophthora roreri* por hongos endófitos, se observó que de los 45 aislamientos evaluados (Figura 12), cinco resultaron ser micoparasitos. Siendo los aislamientos del género *Trichoderma* los únicos que completamente colonizaron al patógeno y fueron considerados como micoparasitos más agresivos, a tal punto que el patógeno no pudo ser recuperado, a diferencia de los otros géneros que ninguno de los aislamientos mostraron ser micoparasitos de *M. roreri*. En la figura 13, se observa la colonización de aislamientos representativos de cada género de hongos endófitos en placas precolonizadas por *M. roreri*, mostrando a *Trichoderma* como el único género que logró colonizar completamente los cultivos de *M. roreri* y con el reaislamiento se comprobó que fueron los micoparasitos más agresivos (Figura 14).

Mientras que en la prueba de micoparasitismo a *P. palmivora*, el análisis de varianza (cuadro 5) del porcentaje de micoparasitismo de hongos endófitos en placas precolonizadas por *P. palmivora*, indica un efecto significativo para los aislamientos ($p \leq 0,05$) con un coeficiente de variabilidad de 19,77 y coeficiente de determinación de 0,98%. Esta diferencia entre tratamientos se debió porque el hongo patógeno no fue colonizado en toda la placa por todos los aislamientos, y se dio una variación en los tratamientos. Así mismo, en la figura 15 y anexo 3, se encontró que no existen diferencias significativas entre los aislamientos del género *Botryosphaeria* mostrándose todos ellos micoparasitos muy agresivos del patógeno; además los

aislamientos del género *Aspergillus* obtuvieron valores considerables entre 70% a 100%, seguidos de *Pestalotiopsis* (15% a 86,67%), *Trichoderma* (13,33% a 100%), *Xylaria* (0 a 100%), *Penicillium* (0 a 26,67%), *Colletotrichum* (0-33,33%), *Clonostachys* (0 a 30%) a diferencia de los géneros *Fusarium* y *Acremoniun* que no mostraron ser micoparasitos de *P. palmivora*.

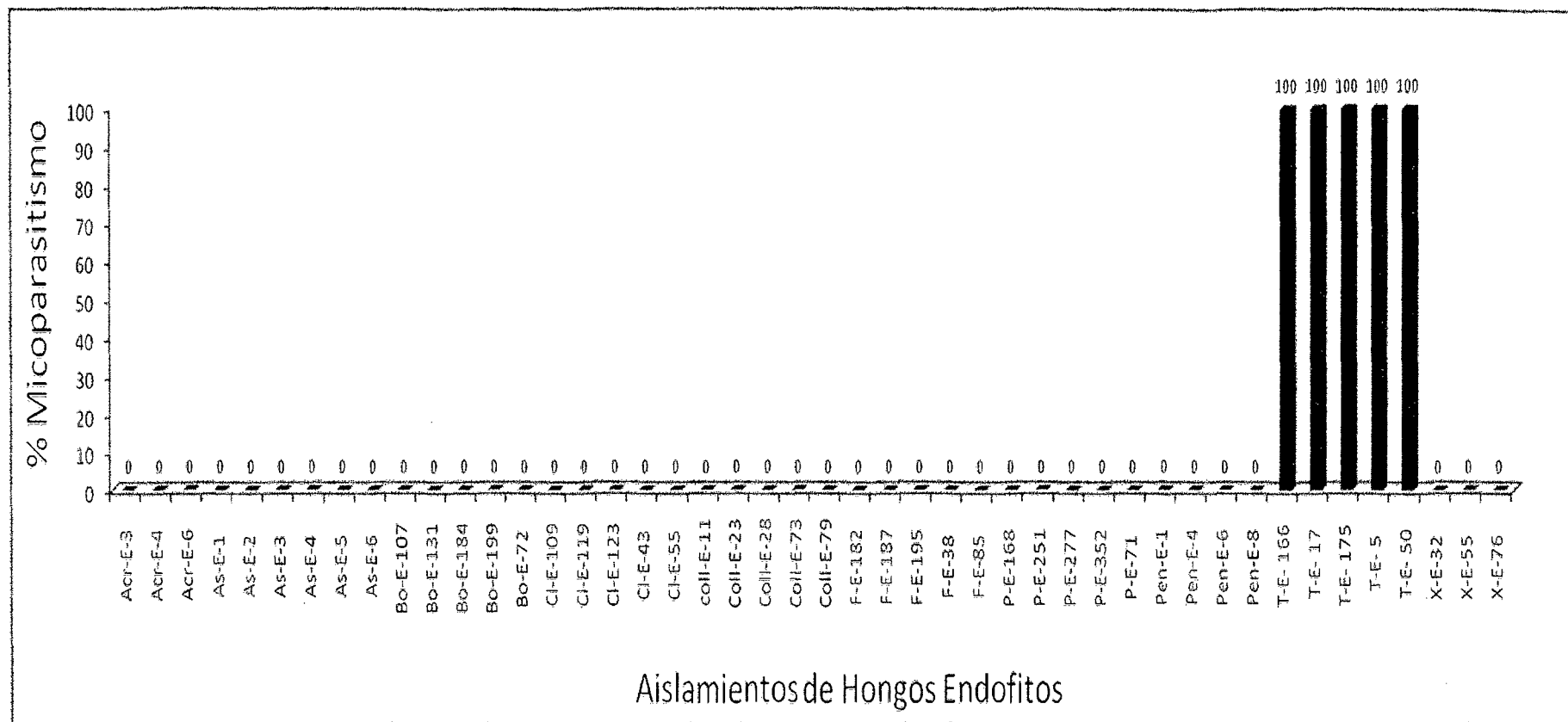


Figura 12: Porcentaje de micoparasitismo de *M. roreri* por aislamientos de Hongos endófitos: *Acremonium* (Acr-E), *Aspergillus* (As-E), *Botryosphaeria* (Bo-E), *Clonostachys* (Cl-E), *Colletotrichum* (Coll-E), *Fusarium* (F-E), *Pestalotiopsis* (P-E), *Penicillium* (Pen-E), *Trichoderma* (T-E), *Xylaria* (X-E).

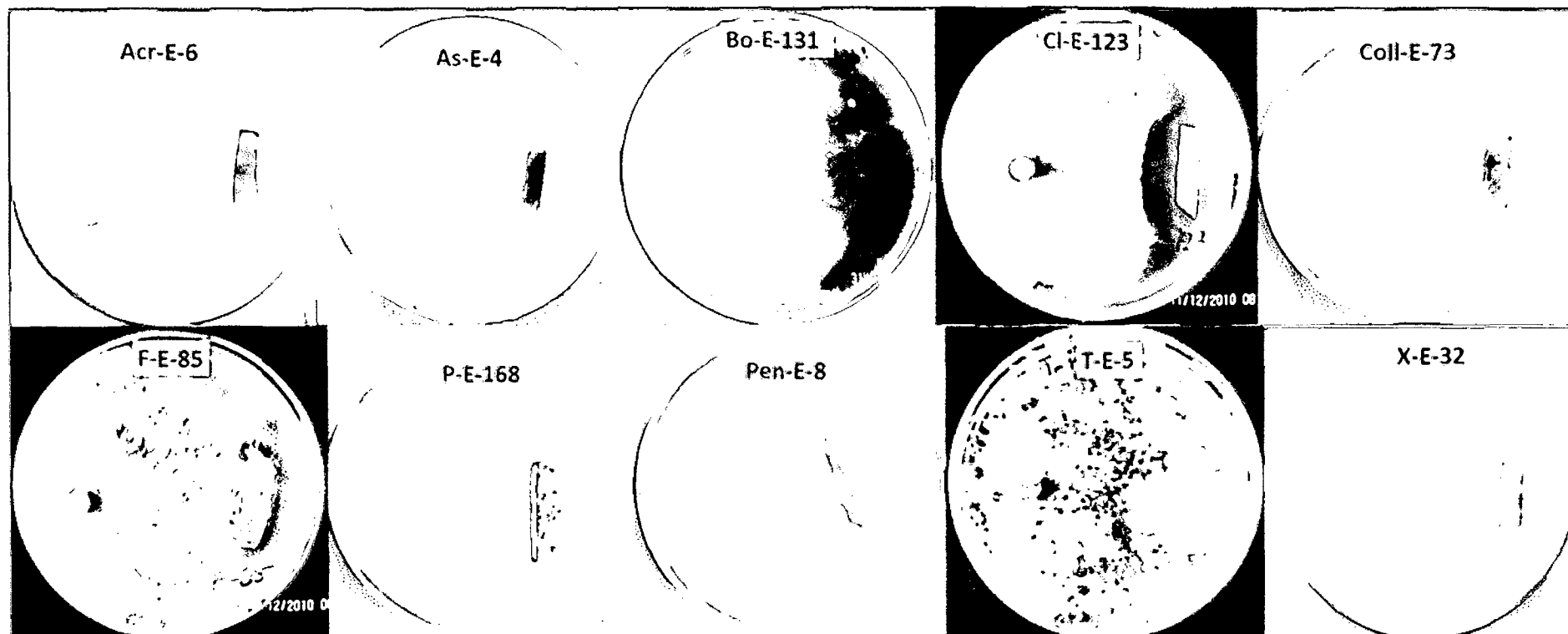


Figura 13: Colonización de hongos endófitos en placas precolonizadas por *M. roreri*, Aislamientos más representativos por cada género: *Acremonium* (Acr-E), *Aspergillus* (As-E), *Botryosphaeria* (Bo-E), *Clonostachys* (Cl-E), *Colletotrichum* (Coll-E), *Fusarium* (F-E), *Pestalotiopsis* (P-E), *Penicillium* (Pen-E), *Trichoderma* (T-E), *Xylaria* (X-E).

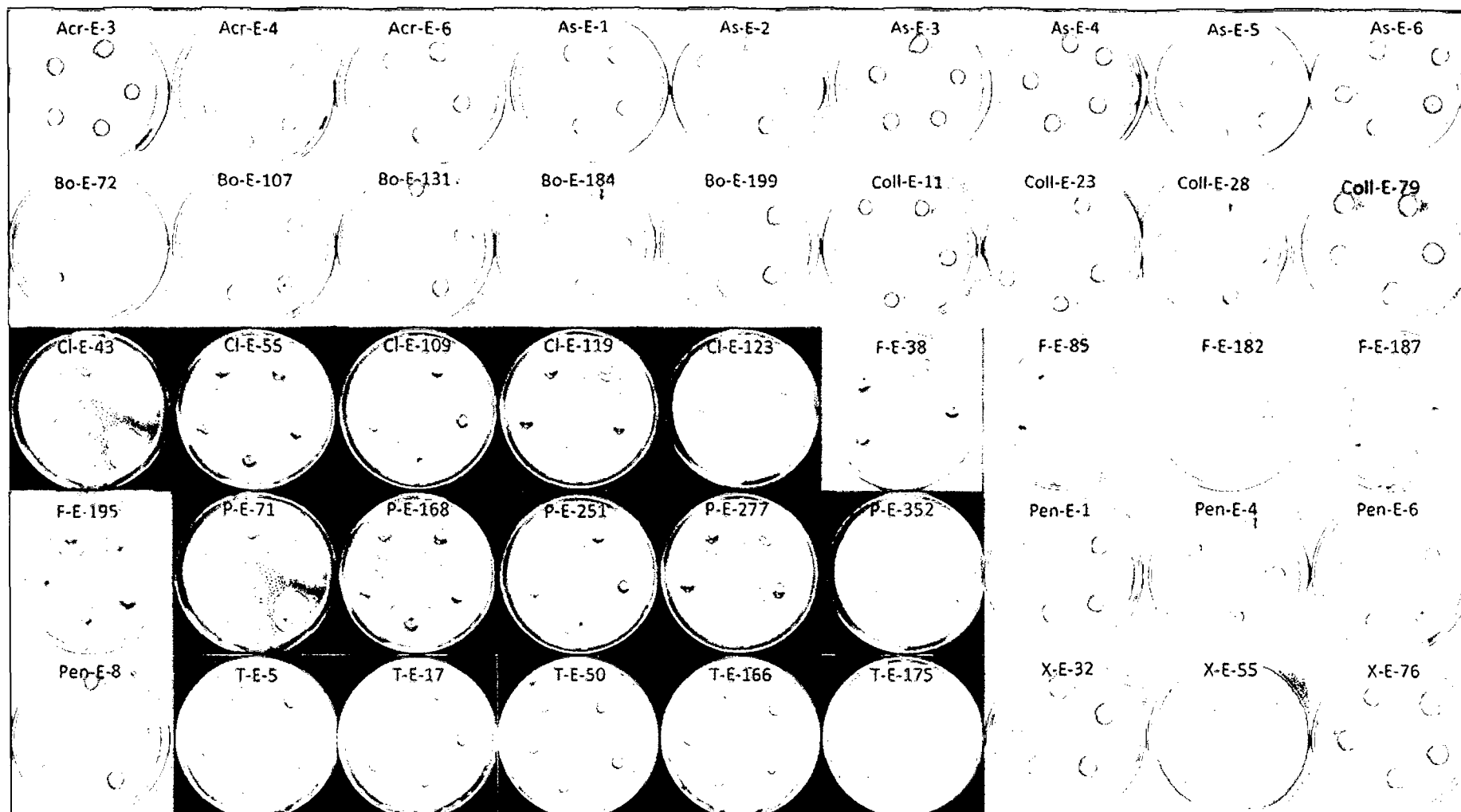


Figura 14: Reaislamiento de placas precolizadas por *M. roreri* a partir de colonias micoparasitadas por aislamientos de diez géneros de hongos endófitos: *Acremonium* (Acr-E), *Aspergillus* (As-E), *Botryosphaeria* (Bo-E), *Clonostachys* (Cl-E), *Colletotrichum* (Coll-E), *Fusarium* (F-E), *Pestalotiopsis* (P-E), *Penicillium* (Pen-E), *Trichoderma* (T-E), *Xylaria* (X-E).

Cuadro 5: Análisis de la Varianza (SC tipo III) del porcentaje de micoparasitismo de Hongos endófitos hacia *P. palmivora*.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	197090,31	44	4479,33	86,28	<0.0001
AISLAMIENTO	197090,31	44	4479,33	86,28	<0.0001
Error	4672,31	90	51,91		
Total	201762,63	134			

Al comparar la capacidad de colonizar de los aislamientos de hongos endófitos sometidos a la prueba de micoparasitismo en placas precolonizadas por *P. palmivora*, se puede destacar los aislamientos de los géneros *Aspergillus* (As-E-6, As-E-5, As-E-3, As-E-1), *Botryosphaeria* (todos los aislamientos), *Trichoderma* (T-E-166, T-E-5) y *Xylaria* (X-E-55) fueron los que mostraron ser micoparasitos muy agresivos, mostrando mayor grado de antagonismo al patógeno (100% de micoparasitismo), lo que se evidenció tanto en la medición numérica como en la observación visual, cabe mencionar que estos tratamientos a pesar de ser los que mayor antagonismo ejercieron sobre el patógeno no presentaron diferencias significativas con el aislamiento As-E-4 que obtuvo 90% de colonización, además los aislamientos P-E-68, P-E-71 y As-E-2 mostraron valores entre 70% a 87% considerándose como buenos micoparasitos hacia el patógeno, por otro lado los géneros *Fusarium* y *Acremonium* no presentan diferencias significativas entre los aislamientos, y fueron los que no tuvieron capacidad de micoparasitar hacia el patógeno.

En la figura 16, se observa la colonización de aislamientos representativos de cada género de hongos endófitos en placas precolonizadas por *P. palmivora*, mostrando a los aislamientos más representativos que lograron

micoparasitar al patógeno y con el reaislamiento realizado se comprobó que fueron los micoparasitos más agresivos (Figura 17).

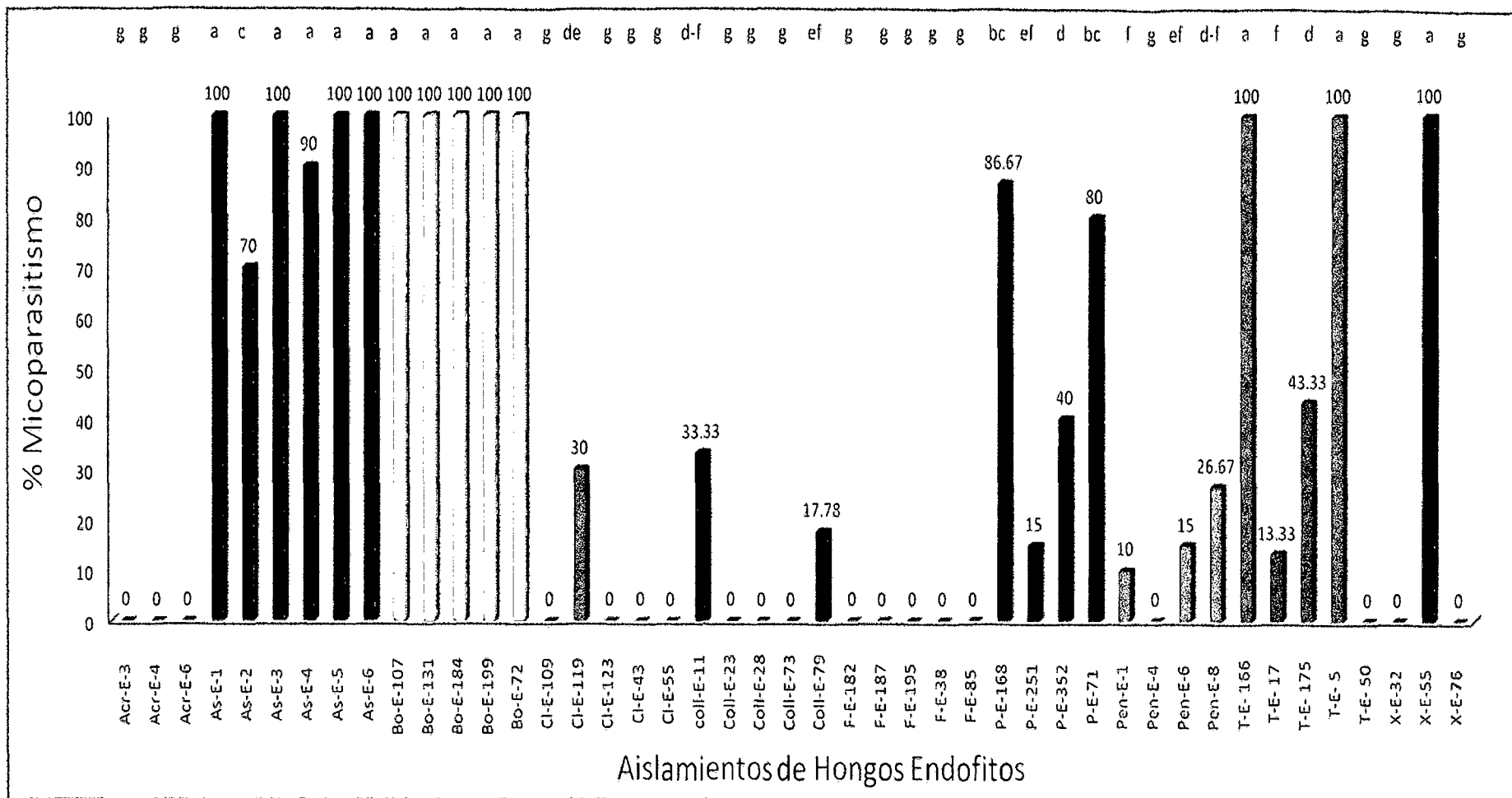


Figura 15: Porcentaje de micoparasitismo de *P. palmivora* por aislamientos de Hongos endófitos: *Acremonium* (Acr-E), *Aspergillus* (As-E), *Botryosphaeria* (Bo-E), *Clonostachys* (Cl-E), *Colletotrichum* (Coll-E), *Fusarium* (F-E), *Pestalotiopsis* (P-E), *Penicillium* (Pen-E), *Trichoderma* (T-E), *Xylaria* (X-E).

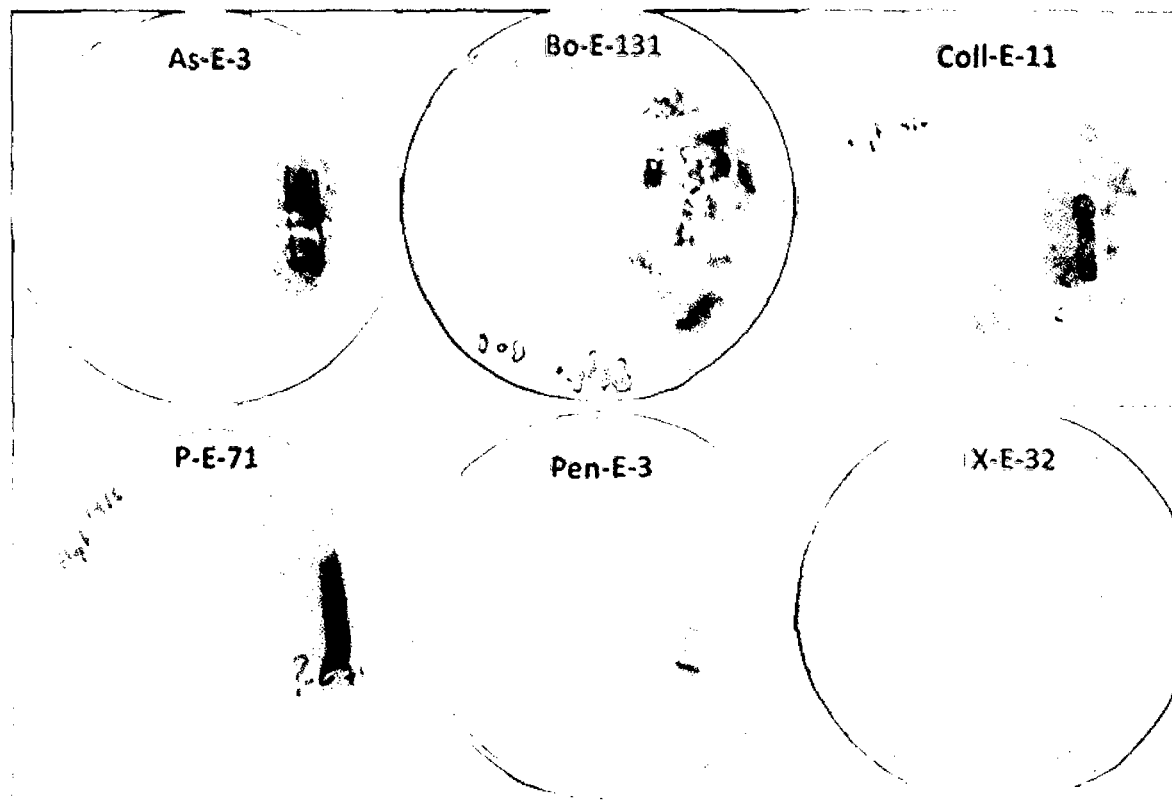


Figura 16: Micoparasitismo de hongos endófitos en placas precolonizadas por *P. palmivora*, aislamientos más representativos de cada género: *Acremonium* (Acr-E), *Aspergillus* (As-E), *Botryosphaeria* (Bo-E), *Clonostachys* (Cl-E), *Colletotrichum* (Coll-E), *Fusarium* (F-E), *Pestalotiopsis* (P-E), *Penicillium* (Pen-E), *Trichoderma* (T-E), *Xylaria* (X-E)

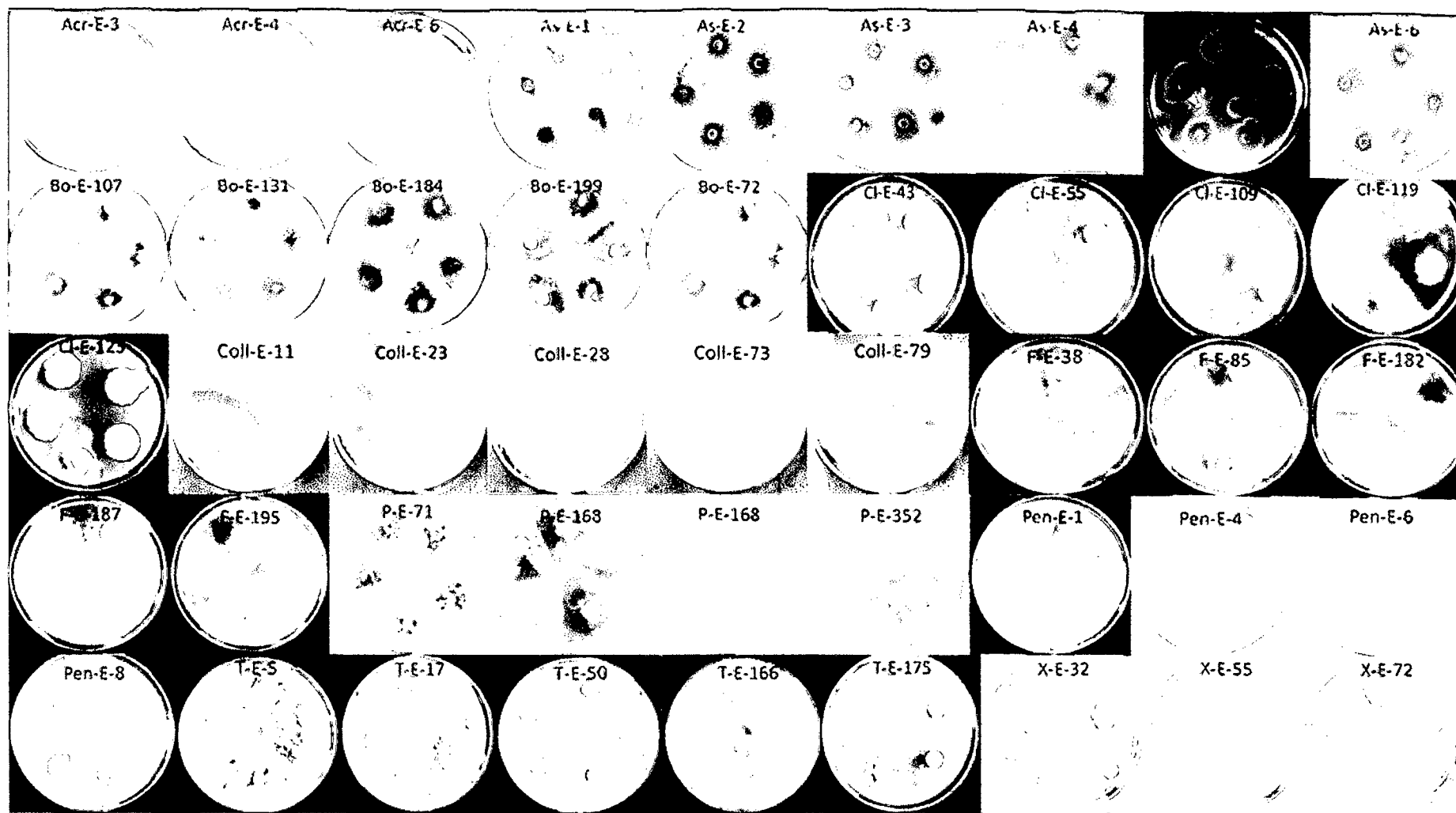


Figura 17: Reaislamiento de *P. palmivora* a partir de colonias micoparasitadas por aislamientos de diez géneros de hongos endófitos : *Acremonium* (Acr-E), *Aspergillus* (As-E), *Botryosphaeria* (Bo-E), *Clonostachys* (Cl-E), *Colletotrichum* (Coll-E), *Fusarium* (F-E), *Pestalotiopsis* (P-E), *Penicillium* (Pen-E), *Trichoderma* (T-E), *Xylaria* (X-E)

5.2 Eficiencia de hongos endófitos en el control de *M. roreri* y *P. palmivora* en frutos y hojas de cacao *in vitro*

5.2.1 Eficiencia de metabolitos secundarios de hongos endófitos en la inhibición de la esporulación de *Moniliophthora roreri* en cilindros de frutos de cacao

El análisis de varianza (Cuadro 6) de la inhibición de esporulación de conidias de *M. roreri* en presencia de los metabolitos secundarios de hongos endófitos, muestra un efecto significativo entre tratamientos ($p \leq 0,05$).

Así mismo, en la prueba de Duncan del promedio de días (Cuadro 7 y Figura 18), se destacó a los metabolitos del aislamiento P-E-168 (97,85 %) con mayor inhibición de conidias de *M. roreri*, seguido de CI-E-119, Acr-E-3, Coll-E-28, X-E-55, T-E-17, F-E-85 y Pen-E-8 con valores entre 97,61% y 94,32% sin mostrar diferencias significativas entre ellos; además, se observa que Bo-E-199 obtuvo el 92,76% de inhibición de conidias; a diferencia de As-E-3 que obtuvo el valor más bajo (87,18%). Estos resultados indican que existe una diferencia en la forma de actuar de cada tratamiento frente a *M. roreri* en comparación del control sin metabolitos. En la figura 19 se observa el efecto de los metabolitos secundarios de hongos endófitos en la prueba de inhibición de conidias de *M. roreri* en los cilindros de frutos de cacao a los 2, 4 y 6 ddi; donde, los aislamientos P-E-168, CI-E-119, Acr-E-3, Coll-E-28, X-E-55, T-E-17, F-E-85 y Pen-E-8 ejercen un efecto antagónico en la esporulación del patógeno en comparación del aislamiento As-E-3 y el control testigo donde se observa el micelio característico de la moniliasis.

Cuadro 6: Análisis de la varianza (SC Tipo III) de la inhibición de conidias de *M. royeri* en presencia de metabolitos secundarios de hongos endófitos seleccionados por su capacidad de biocontrol del patógeno.

FUENTE DE VARIACION	G.L.	SC	CM	Fc	Pr > F
Total de unidades	29	2086,2439	71,9394	6,75	0,0001
Entre tratamientos	9	1372,6050	152,511	4,27	0,0033
Unidades dentro de tratamientos=Error experimental.	20	713,6388	35,6819	3,35	0,0002
Entre Sub unidades dentro de unidades = Error de muestreo	60	639,8484	10,6641		
Total entre Sub unidades	89	2726,0923			

R- Square =0.765287
C.V. =4.085194

Cuadro 7: Prueba de Duncan al porcentaje de inhibición de conidias en tejidos de frutos infectados por *M. royeri*, en presencia de metabolitos secundarios de hongos endófitos.

Aislamientos	% Inhibición de conidias				
	2ddi	4ddi	6ddi	promedio	Test Duncan
Pen-E-8	99,36	92,05	91,53	94,32	ab
P-E-168	98,6	98,23	96,72	97,85	a
Coll-E-28	97,58	95,44	96,95	96,66	ab
F-E-85	96,94	91,29	99,12	95,78	ab
As-E-3	89,29	85,64	86,6	87,18	c
T-E-17	99,49	94,88	93,28	95,88	ab
CL-E-119	98,47	95,62	98,75	97,61	ab
Acr-E-6	99,49	93,49	99,02	97,33	ab
X-E-55	99,23	93,47	96,7	96,47	ab
BO-E-199	95,92	92,88	89,49	92,76	b

- ddi: días después de la inoculación.
- Letras diferentes indican diferencias significativas.

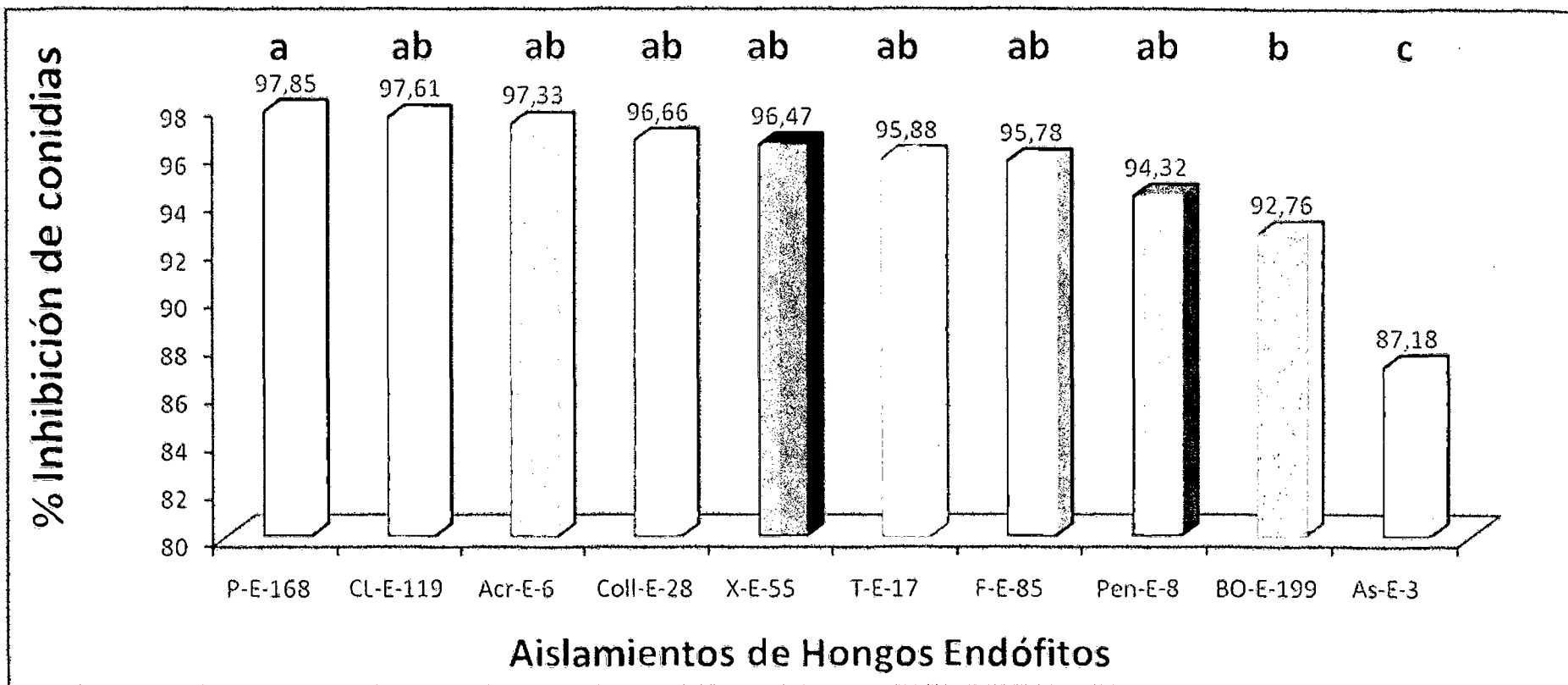


Figura 18: Porcentaje de inhibición de conidias de *M. royeri* en la prueba de cilindros de tejidos infectados en presencia de metabolitos secundarios de hongos endófitos con potencial biocontrolador del patógeno, evaluados a los dos, cuatro y seis días después de inoculación, *Acremonium* (Acr-E), *Aspergillus* (As-E), *Botryosphaeria* (Bo-E), *Clonostachys* (Cl-E), *Colletotrichum* (Coll-E), *Fusarium* (F-E), *Pestalotiopsis* (P-E), *Penicillium* (Pen-E), *Trichoderma* (T-E), *Xylaria* (X-E).

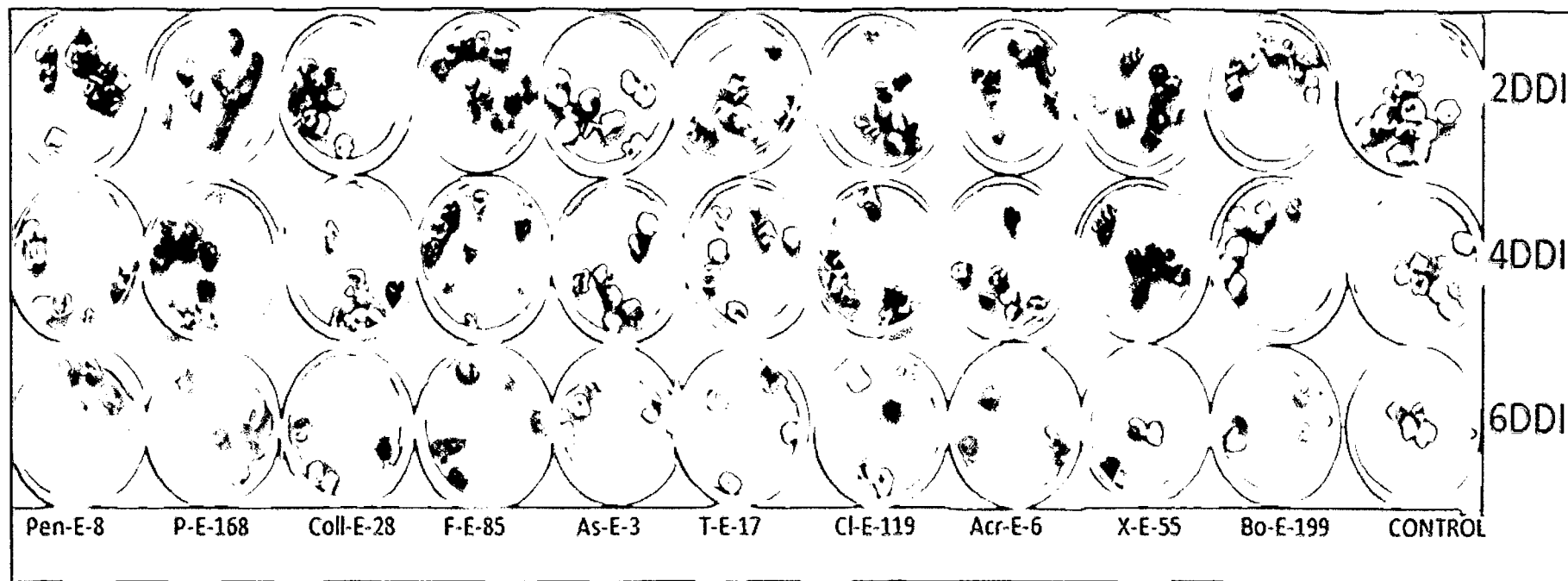


Figura 19: Efecto de los metabolitos secundarios de hongos endófitos sobre la esporulación de *M. royeri* en cilindros de frutos infectados, donde: *Acremonium* (Acr-E), *Aspergillus* (As-E), *Botryosphaeria* (Bo-E), *Clonostachys* (Cl-E), *Colletotrichum* (Coll-E), *Fusarium* (F-E), *Pestalotiopsis* (P-E), *Penicillium* (Pen-E), *Trichoderma* (T-E), *Xylaria* (X-E).

5.2.2 Eficiencia de suspensión de conidias de hongos endófitos en la inhibición de la esporulación de *Moniliophthora roreri* en cilindros de frutos de cacao

El análisis de varianza (Cuadro 8) de la inhibición de esporulación de conidias de *M. roreri* en presencia de suspensión de conidias de hongos endófitos, muestra un efecto significativo entre tratamientos ($p \leq 0,05$).

Así mismo, en la prueba de Duncan del promedio de días (Cuadro 9 y Figura 20), se destacó la suspensión de conidias del aislamiento T-E-5 (97,99 %) con mayor inhibición de conidias de *M. roreri*, seguido de T-E-50, T-E-166 y CI-E-119 con valores entre 93% a 94,68% sin mostrar diferencias significativas entre ellos; además, los aislamientos T-E 17 y T-E175 alcanzaron valores de 90,14% y 91,9%, siendo los valores más bajos entre los tratamientos

Estos resultados indican que existe diferencia en la forma de actuar de cada tratamiento frente a *M. roreri* en comparación del control sin metabolitos. En la figura 21 se observa el efecto de la suspensión de conidias de cada aislamiento de hongos endófitos en la prueba de inhibición de conidias de *M. roreri* en los cilindros de frutos de cacao a los dos, cuatro y seis ddi; donde, la suspensión de conidias de T-E-5 ejerce un efecto antagónico en la esporulación del patógeno en comparación del aislamiento del control testigo donde se observa el micelio blanco cremoso característico de la moniliasis.

Cuadro 8: Análisis de varianza (SC Tipo III) de la inhibición de conidias de *M. roreni* en presencia de suspensión de conidias de hongos endófitos seleccionados por su capacidad de biocontrol del patógeno.

FUENTE DE VARIACION	G.L.	SC	CM	Fc	Pr > F
Total de unidades	23	1005,5648	43,7202	2,83	0,0012
Entre tratamientos	5	429,1608	85,8321	2,68	0,0557
Unidades dentro de tratamientos = Error experimental.	18	576,4039	32,0224	2,08	0,0227
Entre Sub unidades dentro de unidades = Error de muestreo	48	740,4148	15,4253		
Total entre Sub unidades	71	1745,979			

R-Square =0.575932 C.V. = 4.201147

Cuadro 9: Prueba de Duncan al porcentaje de inhibición de conidias en tejidos de frutos infectados por *M. roreni*, en presencia de suspensión de conidias de hongos endófitos.

Aislamientos	% Inhibición de conidias				
	2 ddi	4 ddi	6 ddi	promedio	Test Duncan
T-E-5	96,67	98,77	98,55	97,99	a
T-E-17	93,83	92,38	89,48	91,9	b
T-E-50	86,83	99,09	98,12	94,68	ab
T-E-166	91,67	97,07	90,8	93,18	ab
T-E-175	82,5	95,06	92,86	90,14	b
CL-E-119	95,17	95,99	87,93	93,03	ab

- ddi: días después de la inoculación.
- Letras diferentes indican diferencias significativas.

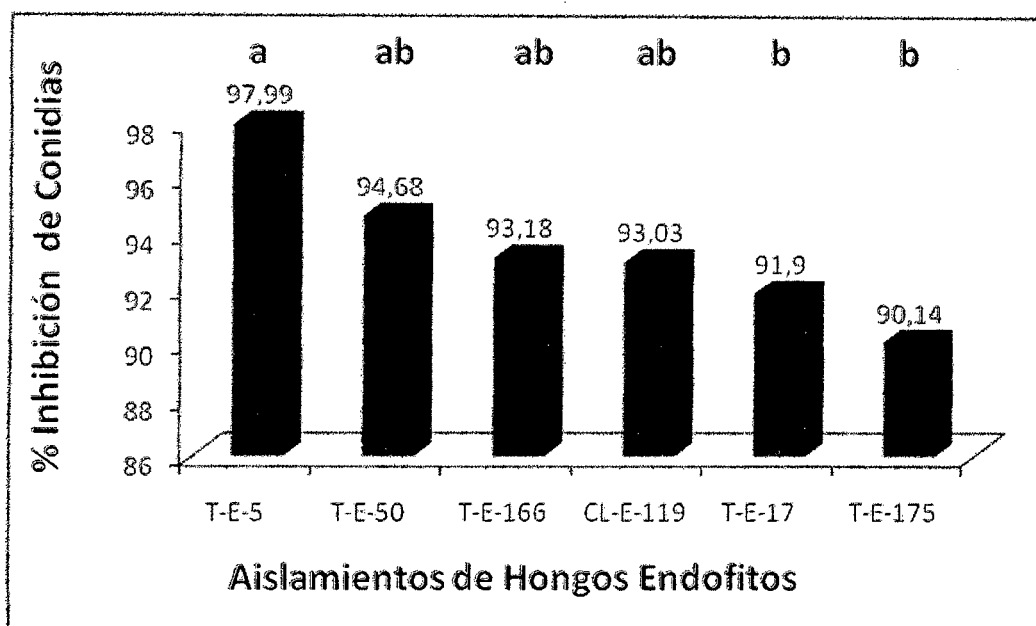


Figura 20: Porcentaje de inhibición de conidias de *M. royeri* en la prueba de cilindros de tejidos infectados en presencia de suspensión de conidias de hongos endófitos con potencial biocontrolador del patógeno, *Trichoderma* (T-E), *Clonostachys* (Cl-E).

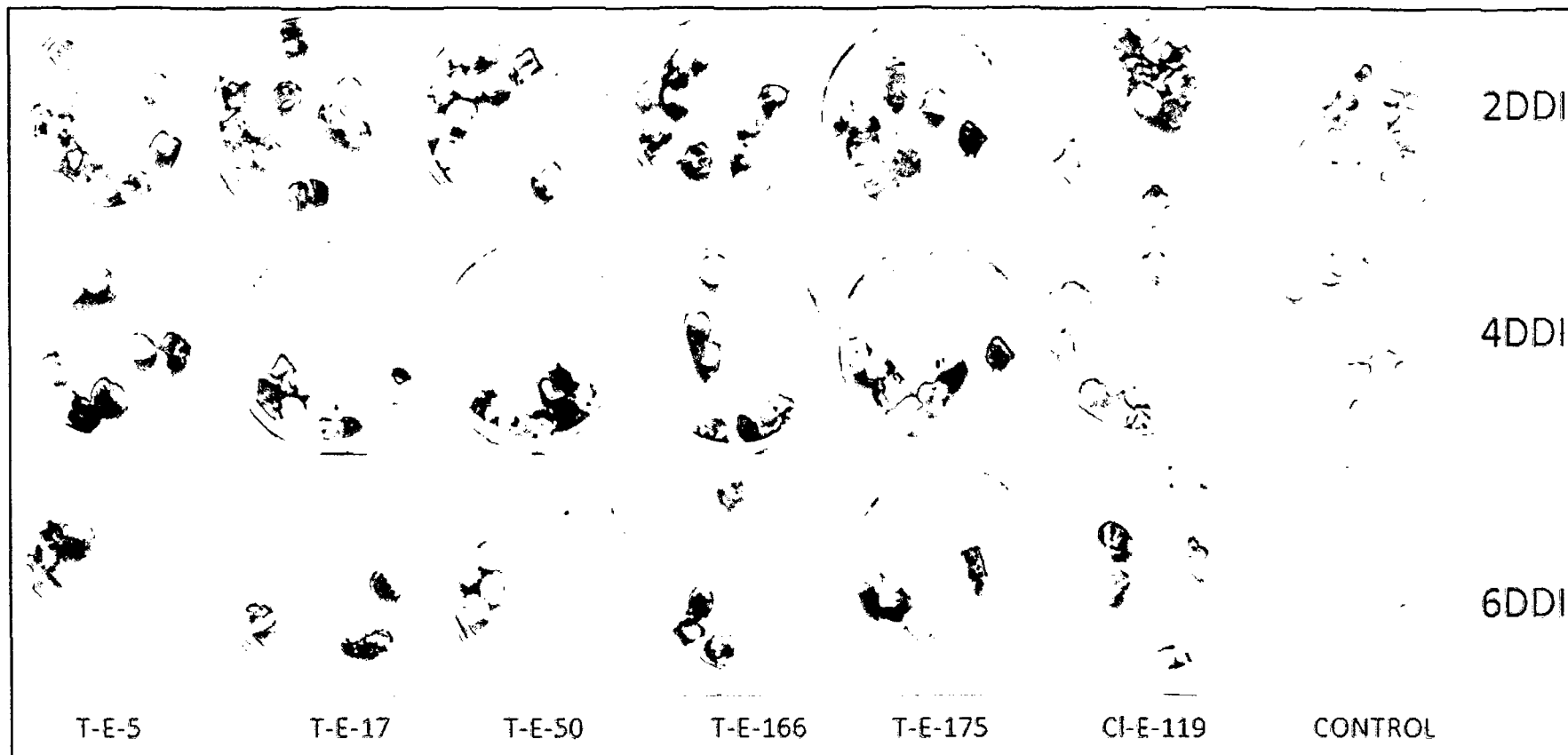


Figura 21: Efecto de la suspensión de conidias de hongos endófitos sobre la esporulación de *M. roreri* en cilindros de frutos infectados, donde: *Trichoderma* (T-E), *Clonostachys* (CI-E).

5.2.3 Eficiencia de metabolitos secundarios de hongos endófitos en el control de *P. palmivora* mediante la técnica de discos de hojas

El análisis de varianza del grado de severidad (promedio de días) de la infección de *P. palmivora* en discos de hojas en presencia de metabolitos secundarios de hongos endófitos indica que existen un efecto significativo entre tratamientos ($p \leq 0,05$) con un coeficiente de variabilidad de 15,73 y coeficiente de determinación de 0,93% (Cuadro10).

Así mismo, el cuadro 11, muestra las medias del grado de severidad de la infección de *P. palmivora* a los tres y cinco ddi, y la prueba de Duncan del promedio de días, donde todos los aislamientos resultaron ser diferentes a los testigos. Siendo, As-E-3 el que obtuvo el menor grado de severidad en la infección de *P. palmivora* con 0,05 de severidad y nos indica que fue el aislamiento que controló mejor la infección de *P. palmivora* a comparación de los demás aislamientos. Por otro lado los aislamientos Coll-E-28 (3,12) y Acr-E-3 (3,07) mostraron los valores más altos de severidad; mientras, que el resto de aislamientos obtuvieron valores entre 2,04 y 2,77 (Figura 22). En la figura 23 se observa los discos de hojas inoculadas con zoosporas en presencia de los metabolitos de los hongos endófitos en comparación de los controles (ADE y Zoosporas), donde se observa claramente que los discos de hojas inoculados con As-E-3, no muestran necrosamiento en el tejido, mientras que los otros aislamientos y el control muestran síntomas de infección en diferentes grados.

Cuadro 10: Análisis de la varianza (SC Tipo III) del grado de severidad de la infección de *P. palmivora* en discos de hojas en presencia de metabolitos inhibitorios de hongos endófitos seleccionados por su capacidad de biocontrol al patógeno.

FUENTE DE VARIACION	G.L.	SC	CM	Fc	Pr > F
Total de unidades	35	131,2921	3,7512	30.04	0.0001
Entre tratamientos	11	126,5581	11,5052	58.33	0.0001
Unidades dentro de tratamientos = Error experimental.	24	4,7340	0,1972	1.58	0.0710
Entre Sub unidades dentro de unidades = Error de muestreo	72	8,9898	0,1248		
Total entre Sub unidades	107	140,2820			

R-Square=0.935916 C.V. =15.78976

Cuadro 11: Prueba de Duncan del grado de severidad de *P. palmivora* (promedio de días) en discos de hojas en presencia de matabolitos secundarios de hongos endófitos.

Tratamientos	Grado de Severidad			
	3 ddi	5 ddi	Promedio	Test Duncan
Acr-E-3	2,54	3,61	3,07	cb
X-E-32	2,11	3,43	2,77	bcd
Coll-E-28	2,72	3,52	3,12	b
P-E-71	1,72	2,74	2,23	ef
Bo-E-199	1,83	3	2,42	def
As-E-3	0	0,09	0,05	g
Pen-E-8	1,39	2,69	2,04	f
F-E-85	2,17	3,07	2,62	cde
T-E-17	1,94	3,35	2,65	cde
Cl-E-109	1,59	2,81	2,2	ef
Control (ADE)	0	0	0	g
Control (Phy)	3,39	3,98	3,69	a

- ddi: días después de la inoculación.
- Letras diferentes indican diferencias significativas.

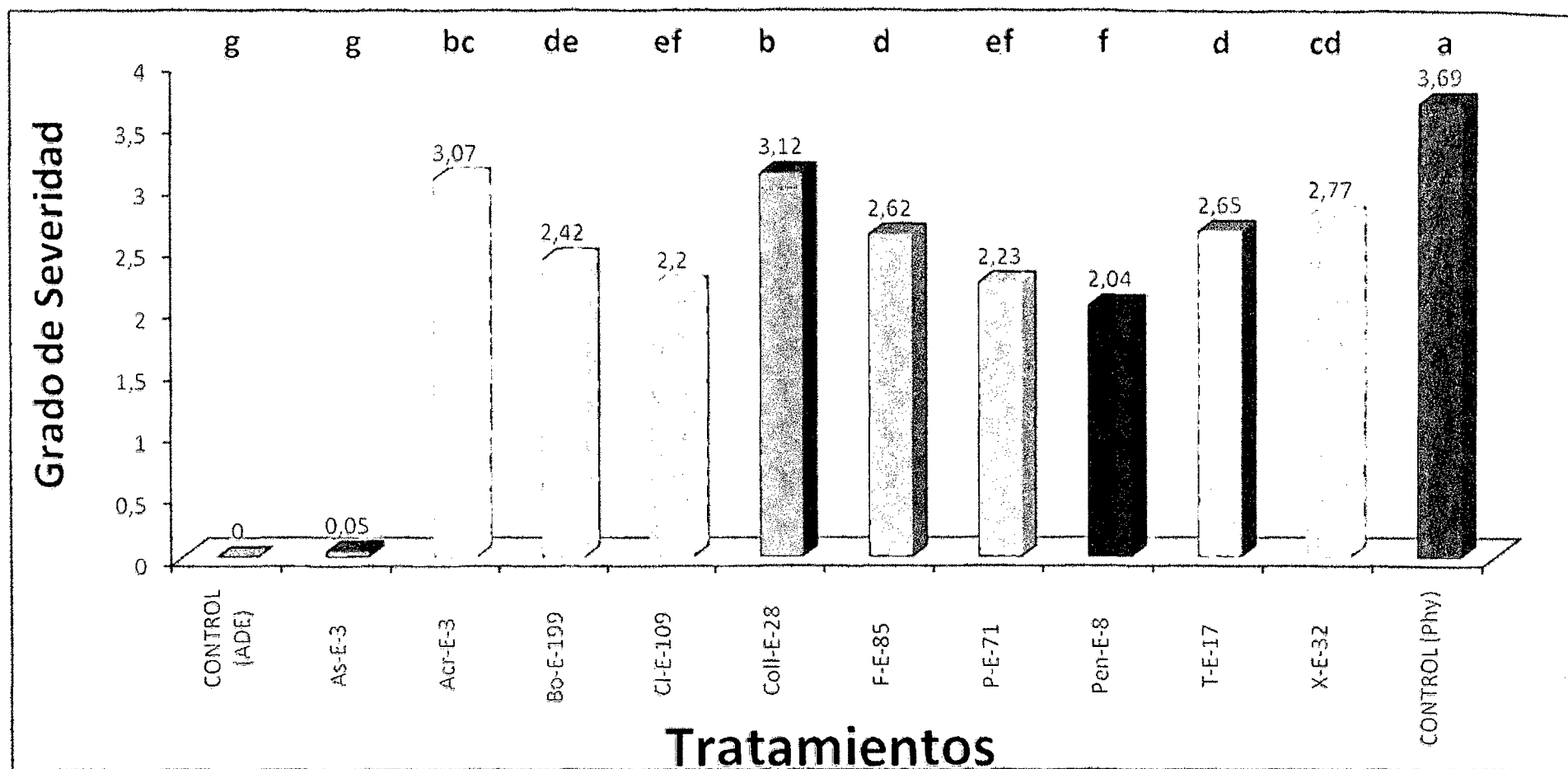


Figura 22: Grado de severidad de la infección de *P. palmivora* en discos de hojas en presencia de metabolitos secundarios de hongos endófitos con capacidad biocontroladora. *Acreminium* (Acr-E), *Aspergillus* (As-E), *Botryosphaeria* (Bo-E), *Clonostachys* (Cl-E), *Colletotrichum* (Coll-E), *Fusarium* (F-E), *Pestalotiopsis* (P-E), *Penicillium* (Pen-E), *Trichoderma* (T-E), *Xylaria* (X-E).

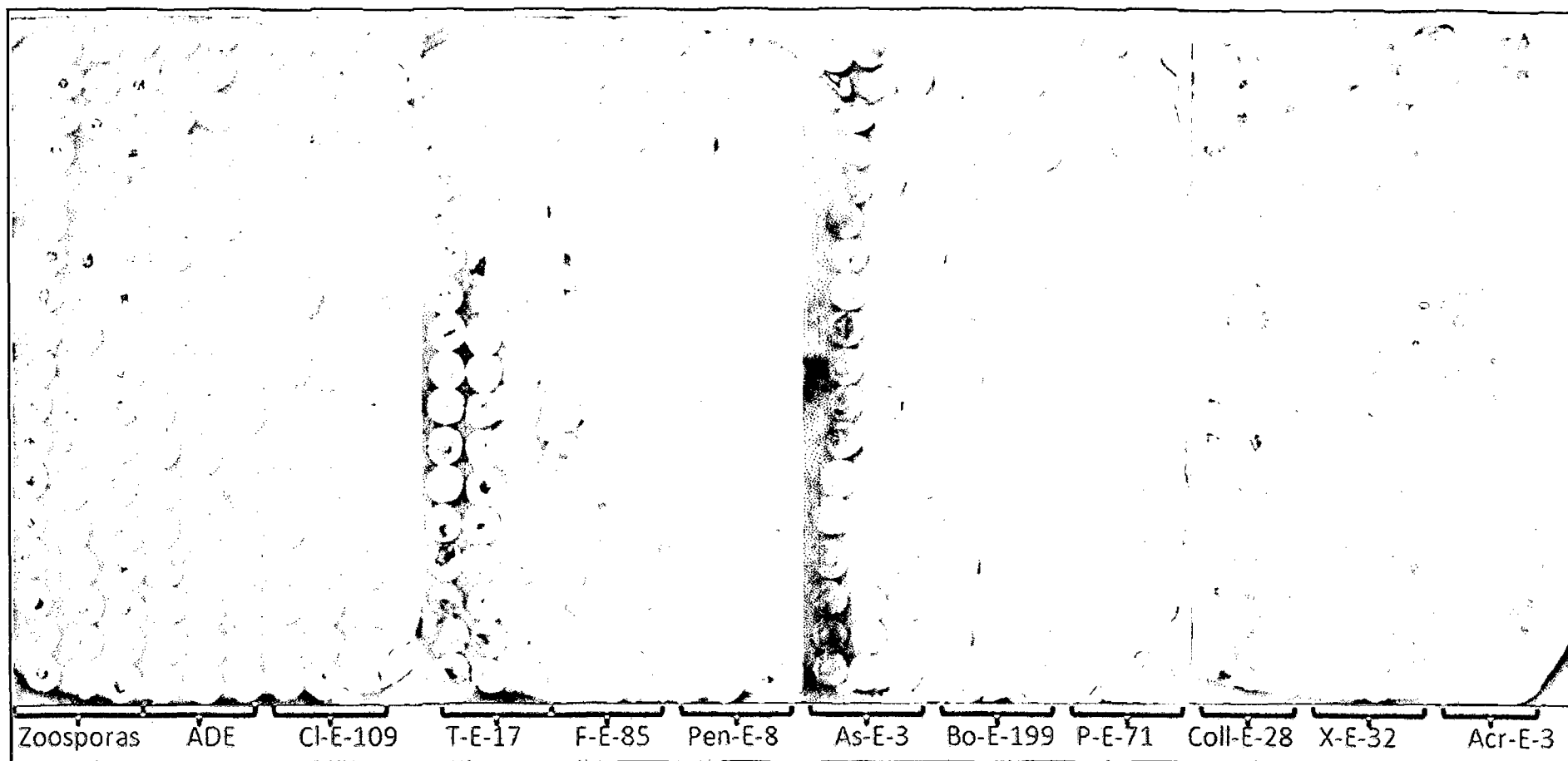


Figura 23: prueba de severidad de la infección de *P. palmivora* en discos de hojas en presencia de metabolitos secundarios de hongos endófitos con capacidad biocontroladora, tres días después de la inoculación de zoosporas, *Acremonium* (Acr-E), *Aspergillus* (As-E), *Botryosphaeria* (Bo-E), *Clonostachys* (Cl-E), *Colletotrichum* (Coll-E), *Fusarium* (F-E), *Pestalotiopsis* (P-E), *Penicillium* (Pen-E), *Trichoderma* (T-E), *Xylaria* (X-E), ADE (agua destilada estéril).

5.2.4 Eficiencia de suspensión de conidias de hongos endófitos en el control de *P. palmivora* en discos de hojas de cacao

El cuadro 11, muestra el análisis de varianza de los tratamientos utilizadas en la determinación de actividad inhibitoria de siete aislamientos de hongos endófitos, sobre la infección de *P. palmivora*, se prosiguió a calcular el grado de severidad de la infección de *P. palmivora* en discos de hojas, en presencia de suspensión de conidias de hongos endófitos y dos controles, el análisis de varianza indica que existen un efecto significativo entre tratamientos ($p \leq 0,05$) con un coeficiente de variabilidad de 16,29 y coeficiente de determinación de 0,91%.

De los nueve tratamientos estudiados, la prueba de Duncan (Cuadro 12) indica que todos los tratamientos son diferentes, mostrando a As-E-3 con menor grado de severidad en la infección de *P. palmivora* siendo este de 1,93; de tal forma que es el tratamiento con el mejor resultado para controlar la enfermedad, produciéndose el menor daño en comparación de los otros aislamientos siendo solo superado por el control con ADE; por otro lado el aislamiento Coll-E-11 obtuvo el valor más alto con 3,23 grados de severidad a diferencia del control con zoosporas que obtuvo un valor de 3,45 grados de severidad de la infección de *P. palmivora* ; mientras que los aislamientos T-E-6 y Cl-E-119 obtuvieron valores de 2,98 y 2,88 respectivamente, por otro lado P-E-168, P-E-71 y Pen-E-8 no mostraron diferencias significativas en los resultados obteniendo valores entre 2,58 y 2,66 (Figura 24); lo que significa que no tuvieron un efecto antagónico sobre el patógeno; en la figura

25 se observa los discos de hojas inoculados con zoosporas en presencia de suspensión de conidias de los hongos endófitos en comparación de los controles (ADE y Zoosporas).

Cuadro 12: Análisis de la varianza (SC Tipo III) del grado de severidad de la infección de *P. palmivora* en discos de hojas en presencia de suspensión de conidias de hongos endófitos seleccionados por su capacidad de biocontrol al patógeno.

FUENTE DE VARIACION	G.L.	SC	CM	Fc	Pr > F
Total de unidades	26	92,8158	3,569841	21.86	0.0001
Entre tratamientos	8	75,9398	9,492480	10.12	0.0001
Unidades dentro de tratamientos = Error experimental.	18	16,8760	0,937558	5.74	0.0001
Entre Sub unidades dentro de unidades = Error de muestreo	54	8,81920	0,163318		
Total entre Sub unidades	80	101,6350			

R-Square = 0.913227 C.V. 16.29300

Cuadro 13: Prueba de Duncan al grado de severidad de *P. palmivora*, en discos de hojas, en presencia de suspensión de conidias de hongos endófitos

Tratamientos	Grado de Severidad			
	3DDI	5DDI	Promedio	Test Duncan
P-E-168	2,33	2,98	2,66	ab
P-E-71	2,28	2,89	2,58	ab
CL-E-119	2,67	3,09	2,88	ab
Coll-E-11	2,93	3,54	3,23	a
Pen-E-8	2,3	2,93	2,61	ab
T-E-5	2,8	3,17	2,98	ab
As-E-3	1,57	2,28	1,93	b
Control (ADE)	0	0	0	c
Control (Phy)	3,28	3,63	3,45	a

- ddi: días después de la inoculación.
- Letras diferentes indican diferencias significativas.

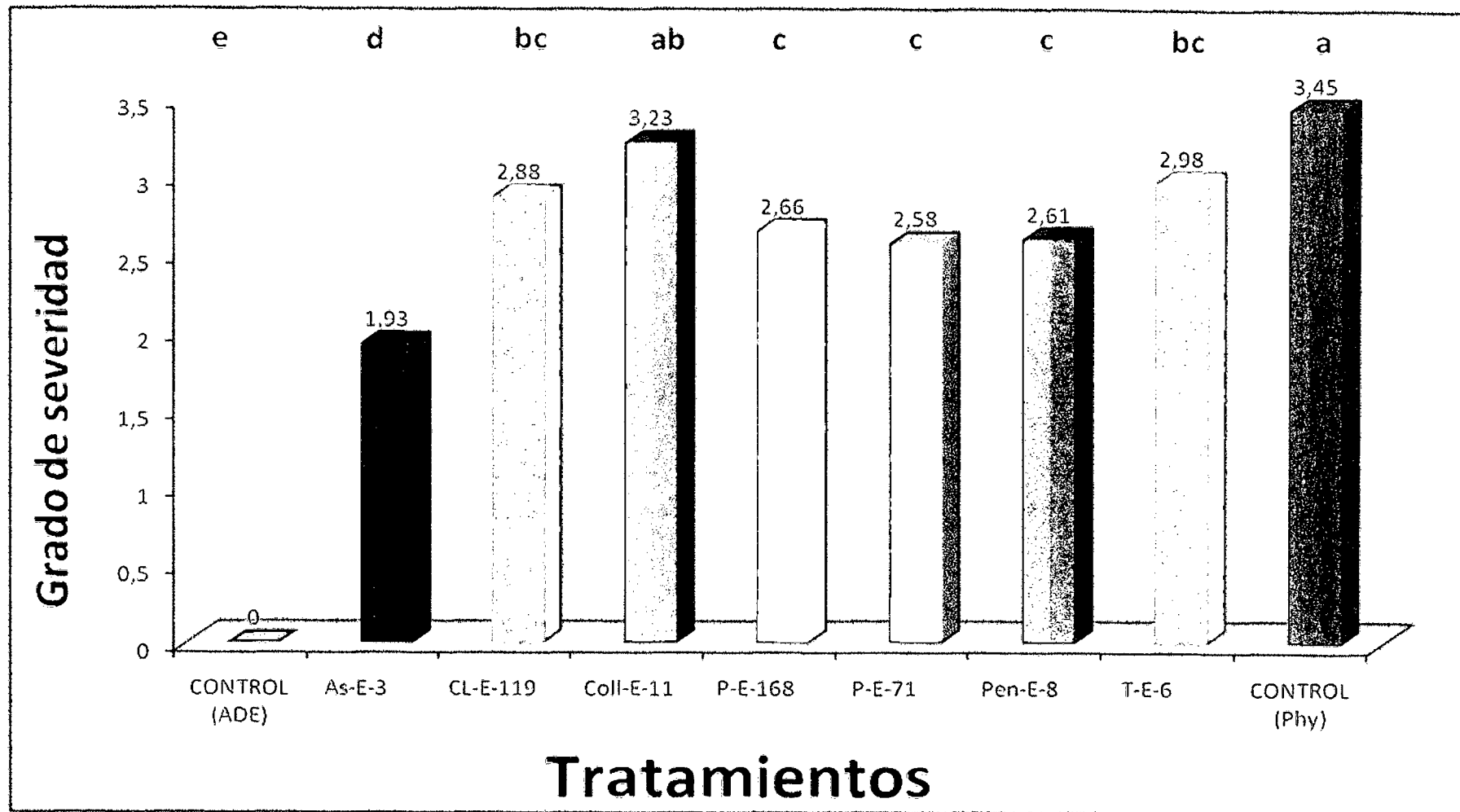


Figura 24: Grado de severidad de la infección de *P. palmivora* en discos de hojas en presencia de suspensión de conidias de hongos endófitos con capacidad biocontroladora: *Aspergillus* (As-E), *Clonostachys* (Cl-E), *Colletotrichum* (Coll-E), *Pestalotiopsis* (P-E), *Penicillium* (Pen-E), *Trichoderma* (T-E), Control (Agua Destilada Estéril), control (Phy)= solo zoosporas.

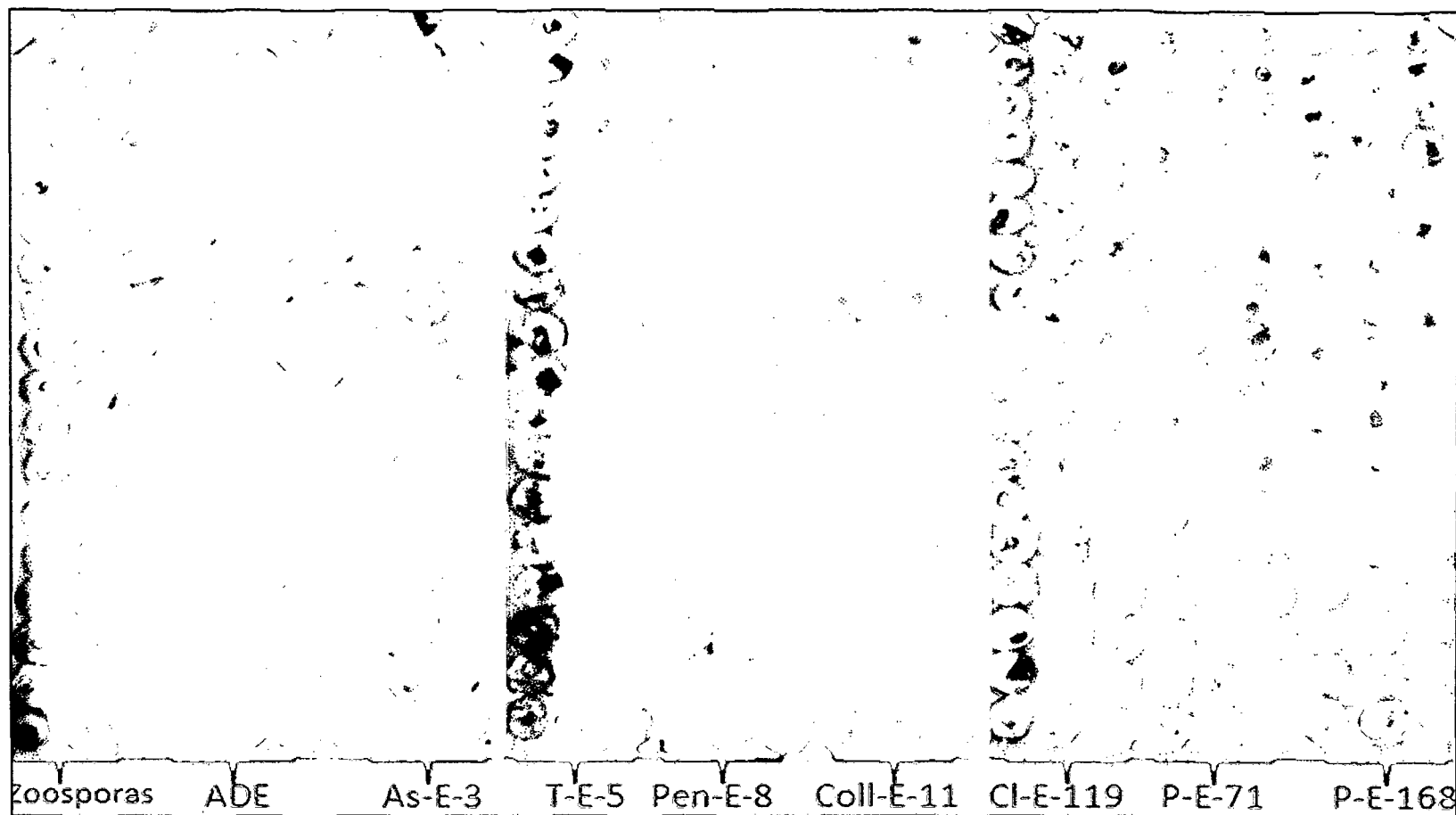


Figura 25: Prueba de severidad de la infección de *P. palmivora* en discos de hojas en presencia de suspensión de conidias de hongos endófitos con capacidad biocontroladora, tres días después de la inoculación de zoosporas. *Acremonium* (Acr-E), *Aspergillus* (As-E), *Botryosphaeria* (Bo-E), *Clonostachys* (Cl-E), *Colletotrichum* (Coll-E), *Fusarium* (F-E), *Pestalotiopsis* (P-E), *Penicillium* (Pen-E), *Trichoderma* (T-E), *Xylaria* (X-E), ADE (agua destilada estéril).

VI. DISCUSIONES DE RESULTADOS

Según los resultados de la capacidad antagónica in vitro de hongos endófitos procedentes del Alto Amazonas sobre *M. roleri* y *P. palmivora*, los aislamientos del género *Aspergillus* (As-E-3, As-E-6 y As-E-1) fueron los que tuvieron mayor efecto en la inhibición micelial de ambos patógenos, seguido de *Penicillium* (Pen-E-8, Pen-E-6 y Pen-E-1), *Botryosphaeria* (Bo-E-199) y *Trichoderma* (TE-17). Así mismo, estos aislamientos en las pruebas de eficiencia, demostraron ser muy buenos biocontroladores en la capacidad de inhibir la esporulación de *M. roleri* y reducir el grado de severidad de *P. palmivora*. La inhibición puede deberse a la producción de metabolitos inhibidores por los hongos antagonistas de prueba (Shanker *et al.*, 1993; Adejumo *et al.*, 1999). Además esto probablemente puede ser el resultado del aumento en la producción o concentración de los metabolitos antifúngicos de estos hongos (Odigie y Ikotun, 1982).

Reportes de la actividad antagonista de *Penicillium* y *Trichoderma*, fueron comprobadas por Santamarina (2000), donde se realizaron ensayos para la detección de la actividad bactericida, fungicida e insecticida de los mismos, obteniéndose resultados positivos, lo que implica que la producción de metabolitos activos está involucrada en el efecto antagonista de estos agentes. Así mismo, Adebola y Amadi (2010), reportaron que aislamientos del género *Aspergillus* mostraron capacidad antagónica hacia *P. palmivora* y mostraron efecto inhibitorio sobre el crecimiento del patógeno. Son varios los metabolitos secundarios de los *Aspergillus* que son considerados micotoxinas: aflatoxinas, esterigmatocistina y

otros, algunos de los cuales también son producidos por especies de *Penicillium*, por ejemplo ácido ciclopiazónico y ocratoxinas (Smith y Ross, 1991). Además *A. flavus*, *A. pseudotamarii* y algunas cepas de *A. caelatus* producen aflatoxinas B1 y B2 mientras que *A. parasiticus* y *A. nomius* forman además aflatoxinas G1 y G2 (Peterson *et al.*, 2000, Ito *et al.*, 2001).

Además, Howell (2003), menciona que *Trichoderma harzianum* produce sustancias como Trichodermina, Dermadina, Sequisterpeno, Suzukacillina, Alamethicina, richotoxina y Acetaldehído, todas con propiedades antifungosas y antibacteriales; así como las enzimas β -1,3 glucanasa, quitinasa y celulasa los cuales facilitan la habilidad del antagonista para atacar un amplio rango de patógenos ejerciendo su efecto sobre las paredes celulares. Además Lieckfeldt y Nirenberg (1999), mencionan que *Trichoderma viride* produce enzimas que tienen efectos fúngicos y puede parasitar *Rizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Pythium sp*, *Phytophthora parasítica*. En un estudio realizado por Lisboa *et al.*, (2003), sobre la actividad antagonista de *Trichoderma* spp hacia los agentes causantes de las enfermedades escoba de bruja y moniliasis; se determinaron la existencia de enzimas hidrolíticas que inhiben la incidencia de la enfermedad en laboratorio de hasta un 80%. La capacidad antagónica obtenida por los aislamientos de *Trichoderma*, constata los múltiples reportes en la literatura relacionados con su efectividad para inhibir y micoparasitar diferentes hongos filamentosos patógenos de plantas, a través de su actividad fisiológica y bioquímica (Baker, 1987; Chet e Ibar, 1994; Howell y Stipanovic, 1995; Handelsman y Stabb 1996; Harman *et al.*, 2004; Vinale *et al.*, 2006).

En la prueba de micoparasitismo de *M. royeri* y *P. palmivora* con hongos endófitos, los aislamientos TE-166 y TE-5 del género *Trichoderma* fueron los micoparasitos más agresivos, los que completamente colonizaron los cultivos de ambos patógenos, a tal punto que los patógenos no pudieron ser recuperados. Así mismo, los aislamientos de los géneros *Aspergillus* (As-E-6, As-E-5, As-E-3, As-E-1), *Botryosphaeria* (todos los aislamientos) y *Xylaria* (X-E-55) fueron los que mostraron ser micoparasitos muy agresivos hacia *P. palmivora*. Sin embargo, los únicos micoparasitos agresivos para *M. royeri* fueron los aislamientos de *Trichoderma*. Además estos aislamientos en las pruebas de eficiencia de suspensión de conidias, ejercieron un efecto antagónico sobre la inhibición de la esporulación de *M. royeri* y reducción del grado de severidad de *P. palmivora*. Estos resultados probablemente se dieron debido a la secreción de enzimas como endoquitinasas, β -1,3-glucanasas (Migheli *et al.*, 1998) y proteasas (Elad y Kapat, 1999; De Marco y Félix, 2002), que permiten la degradación de los componentes de la pared celular de los fitopatógenos y se considera como uno de los mecanismos importantes del control biológico (Howell, 2003). La producción de estas sustancias tiene efectos sobre las estructuras de los patógenos y son un componente importante en el proceso del micoparasitismo (De la Cruz *et al.*, 1992; Goldman *et al.*, 1994; Harman, 2006).

VII. CONCLUSIONES

- 7.1 De la prueba de antibiosis realizada con 46 aislamientos de hongos endófitos, los metabolitos secundarios del aislamiento As-E-3, del género *Aspergillus*, tuvieron mayor efecto en la inhibición micelial de *M. roleri* y *P. palmivora* con 95,13% y 100% respectivamente; así mismo, Bo-E-199, As-E-6, T-E- 175, T-E-17, As-E-1, Pen-E-8 y Pen-E-1 obtuvieron valores de 42,97% a 65,42% de inhibición micelial de *M. roleri*, y Pen-E-6 con 99,46% hacia *P. palmivora*, seguido de As-6, As-E-1, As-E-5, As-E-4, Pen-E-8, Pen-E-1 y Pen-E-10 con valores entre 71,53% a 87,57%.
- 7.2 En la prueba de micoparasitismo de *Moniliophthora roleri* con hongos endófitos, cinco aislamientos pertenecientes al género *Trichoderma* resultaron ser micoparasitos agresivos, los únicos que completamente colonizaron al patógeno. Sin embargo, los aislamientos de los géneros *Aspergillus* (As-E-6, As-E-5, As-E-3, As-E-1), *Botryosphaeria* (todos los aislamientos), *Trichoderma* (T-E-166, T-E-5) y *Xylaria* (X-E-55) fueron los que mostraron ser micoparasitos muy agresivos para *Phytophthora*.
- 7.3 En la prueba de eficiencia de los hongos endófitos sobre la inhibición de esporulación de *M. roleri* en presencia de metabolitos secundarios en cilindros de frutos infectados con el patógeno, el aislamiento P-E-168 presentó mayor inhibición con 97,85 %; seguido de Cl-E-119, Acr-E-3, Coll-E-28, X-E-55, T-E-17, F-E-85 y Pen-E-8 con valores entre 97,61% a 94,32%,

además se observó que Bo-E-199 obtuvo el 92,76% de inhibición de conidias; a diferencia de As-E-3 que obtuvo el valor más bajo siendo este de 87,18%. Sin embargo, en la prueba de eficiencia de suspensión de conidias, muestran que todos los aislamientos de *Trichoderma* ejercieron un efecto antagónico sobre el patógeno, superando el 90 % de inhibición de la esporulación.

- 7.4 En las pruebas de eficiencia de metabolitos secundarios y suspensión de conidias en el control de la infección de *P. palmivora* en discos de hojas, el aislamiento As-E-3 del género *Aspergillus* mostró mayor efecto antagónico sobre la infección del patógeno sobre el tejido, obteniendo un bajo grado de severidad de la enfermedad en ambas pruebas, mostrando grados de 0,05 y 1,93 para metabolitos y suspensión de conidias respectivamente.

VIII. RECOMENDACIONES

- 8.1 Realizar estudios sobre capacidad antagónica de aislamientos de *Aspergillus* y *Penicillium* hacia patógenos de cacao como: *Moniliophthora perniciosa*; *Verticilium dahliae*; *Ceratocystes fimbriata*; *Rosellinia* spp.
- 8.2 Evaluar la eficiencia de hongos endófitos en el control de las principales enfermedades de cacao bajo condiciones de campo.
- 8.3 Determinar la capacidad antagónica de hongos endófitos de cacao hacia los principales patógenos de diversos cultivos de importancia económica.
- 8.4 Realizar estudios sobre metabolitos secundarios de hongos endófitos con capacidad de biocontrol hacia *M. roreri* y *P. palmivora*.
- 8.5 Determinar la capacidad endofítica de los mejores biocontroladores obtenidos en este estudio en tejidos de cacao, mediante pruebas de colonización en plántulas de cacao.
- 8.6 Determinar y cuantificar el proceso de reproducción, en cada método para determinar la formación de esporas propagativas de los patógenos.
- 8.7 Realizar trabajos de investigación en control biológico utilizando microorganismos de materiales recolectados de la región.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Alvarez, C., y Gimenez, M. 2002. Hongos saprofitos con actividad biológica frente a los fitopatógenos *Botrytis cinérea* y *Alternaria solani*, Área de Biotecnología Microbiana, Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas - IIFB, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz – Bolivia
2. Ancízar, M. 1956. Peregrinación de Alpha. Por las provincias del norte de Nueva Granada, en 1950-51. Bogotá, Colombia. Empresa Nacional de Publicaciones.
3. Anónimo. 1932. El cacao. El cultivador cundinamarqués. Periódico de la Industria Agrícola y de la Economía Doméstica, 7.
4. Aranzazu, F. 1987. Comportamiento de los frutos de cacao afectados por monilia dejados sobre el suelo. 10ª Conferencia Internacional de Investigación en Cacao. Santo Domingo, República Dominicana. 457-460.
5. Arenas, E. 1993. Historia de la Provincia de Soto. Bucaramanga, Colombia. Universidad Industrial de Santander.
6. Attard, A., Gourgues, M., Galiana, E. Panabières, F, Ponchet, M and Keller H. 2008. Strategies of attack and defense in plant-oomycete interactions, accentuated for *Phytophthora parasitica* Dastur (syn. *P. nicotianae* Breda da Haan). Journal of Plant Physiology 165:83-94.
7. Avalos, A. y Perez-Urria, E. 2009. Metabolismo secundario de plantas, Departamento de Biología Vegetal I (Fisiología Vegetal). Facultad de

Biología. Universidad Complutense. Madrid. Serie Fisiología Vegetal. 2
(3): 119-145,

8. Bailey, B. A., Bae, H., Strem, M. D., Crozier, J. Thomas, S. E., Samuels, G. J., Vinyard, B. T., and Holmes, K. A., 2008. Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. Article in Press. Biological Control (2008), doi: 10.1016/j.biocontrol.2008.01.003.
9. Baker, E., Cope, W., Holliday, C., Bartley, G., and Taylor, J. 1954. The Anglo-Colombian Cacao-collecting expedition. Report of Cacao Research. Trinidad, v1953, p. 8-29.
10. Baker, W. 1981. The Chocolate Plant (*Theobroma cacao*) and its products. Jhon Wilson and son. Cambridge, England. 164 p.
11. Barahona, J. 1987. Manual del Cultivo del Cacao. INIAP. Quevedo, Ecuador. 109 p.
12. Barros, O. 1977. Investigaciones sobre el hongo *Monilia roreri* Cif. & Par., causante de la pudrición acuosa de la mazorca del cacao: sus daños y control. El Cacaotero Colombiano 3: 42-52.
13. Berry, D. and Cilas, C. 1994. Etude génétique de la réaction à la pourriture brune des cabosses de cacaoyers issus d'un plan de croisement dialléle. Agronomie 14:599-609.
14. Brasier, C. and Hansen, E. 1992. Evolutionary biology of *Phytophthora* aart II: phylogeny, speciation, and population structure. Annual Review of Phytopathology. 30:173-200.

15. Brenes, O. 1983. Evaluación de la resistencia a *Monilia roreri* y su relación con algunas características morfológicas del fruto de cultivares de cacao (*Theobroma cacao* L.). Tesis MSc. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica. 60p.
16. Cabi Bioscience. 2002. Estados Unidos http://www.worldcocoafoundation.org/scientific-research/research-library/pdf/cabi_part2.pdf. Disponible en internet, visitado diciembre de 2010.
17. Campbell, R. 1989. Biological control of microbial plant pathogens. Cambridge University Press Cambridge .218 p.
18. Capriles de Reyes, L. 1977. Enfermedades del cacao en Venezuela. Boletín del Fondo Nacional del Cacao. Venezuela. 79 p.
19. Centro Agronomía Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Informe anual 1987-1988. Turrialba, Costa Rica ISBN 9977-57-047-7. <http://books.google.com.co/books?id=VyEOAQAIAAJ&pg=PA59&lpg=PA59&dq=P.+palmivora+antagonistas&source=bl&ots=8glVJF8eDh&sig=9AtBVwN4vcv4xFMhxBSNDRLIeks#v=onepage&q=P.%20palmivora%20antagonistas&f=false> Disponible en internet. visitado Diciembre de 2010
20. Centro de Comunicación Agrícola de la FHIA. 2003. Identificación y Control de la Moniliasis del Cacao. La Lima, Cortés, Honduras, C.A.
21. Chacín, L. 1975. Algunos aspectos biológicos y patogénicos del hongo *Monilia roreri* agente causal de moniliasis en cacao. Trabajo especial de grado

para optar al título de Ingeniero Agrónomo Universidad del Zulia,
Facultad de Agronomía. Maracaibo, Ven. 66 p.

22. Chacín, L. 1981. La moniliais del cacao (*Monilia roreri* Cif. y Par.). Trabajo de ascenso para optar a la categoría de profesor asistente. Colegio Universitario de Maracaibo. Maracaibo, estado Zulia, Ven. 59 p.
23. Cubillos, G. 1981. Exploraciones acerca de la importancia que tienen los frutos enfermos dejados sobre el suelo como fuentes primarias de infecciones de *Moniliophthora roreri* (Cif. y Par.) Evans *et al.* El Cacaotero Colombiano 18:38-43.
24. Cuhn, R. 2006. Estructura genética de populações de *Crinipellis pernicioso* e *Moniliophthora roreri* utilizando marcadores RAPD e SSR (tesis de doutorado) Universidade Estadual Paulista. São Paulo, Brasil. 117 p.
25. Dennis, J. and Konam, J. 1994. *Phytophthora palmivora*: Cultural control methods and their relationship to disease epidemiology on cocoa in PNG. Proceedings of the 13th International Cocoa Research Conference, Yamoussoukro, Côte d'Ivoire, 18-24 July. Cocoa Producers Alliance, London, pp. 953-957.
26. Efombagn, M., Marelli, J., Ducamp, M., Cilas, C., Nyassé, S., and Vefonfe, D. 2004. Effect of fruiting traits in the field resistance of cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones to *Phytophthora megakarya*. Journal of Phytopathology 152:557-562.
27. Enríquez, G., y Suárez, C., 1978. Monilia disease of Cacao in Costa Rica. Turrialba 28: 339-340.

28. Evans, H., and Bastos, C. 1979. Uma reavaliação do ciclo da vida da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis perniciosa*) do cacau. *Fitopatologia Brasileira* 4:104.
29. Evans, H., Holmes, K., and Reid, A., 2003. Phylogeny of the frosty pod rot pathogen of cocoa. *Plant Pathology*. 52:476-485.
30. Evans, H. 1981. Pod rot of Cacao caused by *Moniliophthora (Monilia) roreri*. *Phytopathological Papers* N° 24. Kew, England. Commonwealth Mycological Institute 44 p.
31. Evans, H. 1986. A reassessment of *Moniliophthora roreri* (Monilia) pod rot of cocoa. *Cocoa Grower's Bulletin* 37:34-43
32. Evans, H. 2007. Cacao diseases – The trilogy revisited. *Phytopathology* 97:1640-1643.
33. Evans, H.C., Holmes, K.A., and REID, A.P. 2003. *Plant Pathology. Phylogeny of the frosty pod rot pathogen of cocoa*. 52, 476-485.
34. Flood, J., and Murphy, R. 2004. *Cocoa futures: A source book of some important issues facing the cocoa industry*. The commodities Press. 163 p.
35. Galindo, J. 1986. Efecto de poda sanitaria y prácticas culturales sobre el combate de mazorca negra y moniliais del cacao. En: *Memorias del Seminario Taller de Fitopatología. Informe Técnico N° 81*. Panamá.
36. Griffith, G., Nicholson, J., Nenninger, A., and Birch, R. 2003. Witches' brooms and frosty pods: two major pathogens of Cacao. *New Zealand Journal of Botany* 41:423-435.

37. Griffith, J., Smillie, R., Nieri, J., and Grant, B. 1992. Target sites of fungicides to control oomycetes. In W. Koller (Eds.), Target sites of fungicides. CRC Press FL. Boca Ratón, pp. 69–99.
38. Guest, D. 2007. Black pod: diverse pathogens with a global impact on cocoa yield. *Phytopathology* 97:1650-1653.
39. Hebbar, P. 2007. Cacao diseases: A global perspective from an industry point view. *Phytopathology* 97:1658-1663.
40. Hernández, T., Aranzazu, F., Arévalo, E., y Ríos R. 1990. La moniliasis del cacao en el Perú. *Agrotrópica* 2:56-58.
41. Hernández, T., Ríos, R., y Arévalo, E. 1991. Enfermedades del cacao. Pp. 42-44.
42. Howell, C. R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease* 87: 4 – 10.
43. Ito, Y. *et al.* 2001. *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*. *Mycological Research* 105: 233-239.
44. Iwaro, A., Screenivasan, T., and Umaharan, P. 1999. *Phytophthora* resistance in Cacao (*Theobroma cacao*): Influence of pod morphological characteristics. *Plant Pathology* 46:557-565.
45. Judelson, H., and Blanco, F. 2005. The spores of *Phytophthora*: weapons of the plant destroyer. *Nature Reviews Microbiology* 3:47-58.

46. Kellman, M., and Zentmyer, G. 1986. Comparisons of singleospore isolates of *Phytophthora* species from naturally infected cocoa pods in Brazil. *Mycologia* 78:351-358.
47. López, M., Martins, E. 2005. Principais doenças do cacaueiro no Brasil. Ilhéus, CEPLAC/CEPEC/SEFIT. 132 p.
48. López, M. y Enríquez, V. 1980. Presencia de *Monilia roreri* Cif. et Par. en el cacao, *Theobroma cacao* L. en la frontera de Costa Rica, Nicaragua. Ministerio de Desarrollo Agropecuario, Managua, Nicaragua.
49. Markes, K. 2010. Capacidad micoparasitismo in vitro de aislamientos de *Clonostachys sp.* endófito contra principales patógenos del cacao. VII jornada técnica de investigación y extensión agrícola para el desarrollo de la amazonia peruana. p 10
50. McLaughlin, H. 1950. Observation on Cacao in Peru. Cacao Inform. Bulletin 2:3-4
51. McMaho, P., and Purwantara, A. 2004. Major crops affected by *Phytophthora*. En André Drenth y David Guest. Diversity and Management of *Phytophthora* in Southeast Asia. ACIAR Monograph 114. 104-105 p.
52. Merchán V. 1981. Avances de la investigación de la moniliasis del cacao en Colombia. El Cacaotero Colombiano 16:26-41.
53. Meza, C. 1973. Efectos del Benlate y Cupravit sobre el combate de la moniliasis y mancha de agua del cacao. Revista de la Facultad de Agronomía. LUZ. Venezuela 2 (2): 87-94.

54. Miguel, A., y Gamboa-Gaitán, hongos endófitos tropicales: Conocimiento actual y perspectivas, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, AA 14490.
55. MINAG, 2005. Dirección Nacional de Información Agraria.
56. MINAG, 2003. "Caracterización de las Zonas Productoras de Cacao en el Perú y su Competitividad".
57. Muller. 1941. El reconocimiento de las enfermedades de las plantas cultivadas en Venezuela. Boletín de la Sociedad Venezolana de Ciencias Naturales 8:99-113.
58. Navarro, M., y Mendoza, I. 2006. Guía Técnica para Promotores Cultivo del Cacao en Sistemas Agroforestales. Programa para el Desarrollo Rural Sostenible en el Municipio El Castillo, Río San Juan, Nicaragua.
59. Omokolo, N. Nankeu, D. Niemenak, N. Djocgoue, P. 2002. Analysis of amino acid and carbohydrates in the cortex of nine clones of *Theobroma cacao* L. in relation to their susceptibility to *Phytophthora megakarya* Bra. And Grif. Crop Protection 21:395-402.
60. Orellana, R. 1956. La moniliasis y otras enfermedades del cacao en el este de Panamá. Boletín Fitosanitario FAO 4:168-169.
61. Peterson, S. W. 2000. Genetic variation and aflatoxin production in *Aspergillus tamaris* and *A. caelatus*. en: Integration of Modern Taxonomic Methods for *Penicillium* and *Aspergillus* Classification. Samson RA, Pitt JI, editores. Harwood Academic Publishers, Australia. pp. 447-458.

62. Phillips-Mora, W., Aimes, M., and Wilkinson, M. 2007. Biodiversity and biogeography of the Cacao (*Theobroma cacao*) pathogen *Moniliophthora roreri* in tropical America. *Plant Pathology* 56:911-922.
63. Phillips-Mora, W., Cawich, J., Garnett, W., and Aimes, M. 2006a. First report of frosty pod (moniliasis disease) caused by *Moniliophthora roreri* on Cacao in Belize. *Plant Pathology* 55:584.
64. Phillips-Mora, W., Coutiño, A., Ortiz, C., López, A., Hernández, J., and Aimes, M. 2006b. First report of *Moniliophthora roreri* causing frosty pod rot (moniliasis disease).
65. Phillips-Mora, W., and Wilkinson, M. 2007. Frosty pod of Cacao: A disease with limited geographic range but limited potential for damage. *Phytopathology* 97:1644-1647.
66. Pokou, N., Goran, J., Kébe, I., Eskes, A., Tahi, M., and Sangaré A. 2008. Levels of resistance to *Phytophthora* pod rot in cocoa accessions selected on-farm in Côte d'Ivoire. *Crop Protection* 27:302-309.
67. Porras, V., and Enríquez, V. 1988. Spread of monilia pod rot of cocoa through Central America. IICA, San José, Costa Rica.
68. Porras, V. 1983. Epifitología de la moniliasis (*Monilia roreri* Cif. y Par.) del cacao y su relación con la producción del árbol en la zona de Matina. *El Cacaotero Colombiano* 25:28-29.
69. Porras, V. H. y Sánchez, J. A. 1991. Enfermedades del cacao. IICA Procacao. Fascículo W 5. p. 10-14.

70. Prakob, W., and Judelson, H. 2007. Gene expression during ooprogenesis in heterothallic and homothallic *Phytophthora*. *Fungal Genetics and Biology* 44:726-739.
71. Ram, A., Valle, R., Arévalo, E. 2004. A monilia do cacaueiro. São Paulo, SP. Fundação Cargill. 36 p.
72. Rorer, J. B. 1926. Ecuador cacao. *Tropical Agriculture (Trinidad)* 3(4):68-69 (Concl.).
73. Rogério, E., Hanada, A., Alan W.V., Pomella, B., Whilly Soberanis, C., Leandro, L., Loguercio, D., José, O., and Pereira, E. 2010. Biocontrol potential of *Trichoderma martiale* against the black-pod disease (*Phytophthora palmivora*) of cacao.
74. Salgado, Catalina y María C. Cepero De García, 2005. Aislamiento de hongos endófitos en rosa (*Rosa hybrida*, Centro de Investigaciones Microbiológicas CIMIC, Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia. 22: 99-101.
75. Sánchez, L., Gamboa, E., y Rincón, J. 2003. Control químico y cultural de la moniliasis (*Moniliophthora roreri* Cif y Par) del cacao (*Theobroma cacao* L.) en el estado Barinas. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 20: 188-194
76. Smith, J.E., and Ross, K. 1991. The toxigenic Aspergilli. en: *Mycotoxins and Animal Foods*. Smith JE, Henderson RS, editores. CRC Press, Boca Ratón, Florida. pp. 101-108
77. Stamps, J. 1998. *Phytophthora palmivora*. CMI Description of pathogenic fungi and Bacteria N° 831. Set N° 84.

78. Tahí, G., Kébe, B., Goran, J., Sangaré, A., Mondeil, F., Cilas, C., and Eskes, A. 2006. Expected selection efficiency for resistance to Cacao pod rot (*Phytophthora palmivora*) comparing leaf disc inoculations with field observations. *Euphytica* 149:35-44.
79. Tong, K. 1983. El control de *Phytophthora palmivora* en orquídeas con algunos fungicidas sistémicos y Nueva Norma. *Pertanika*, 6 (1). pp 34-39.
80. Urquillas, L. 2004. Inducción de la germinación para mejorar la eficiencia de dos agentes antagónicos para el control de la monilia (*Crinipellis roreri*) del cacao (*Theobroma cacao*) (tesis de Maestría) Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Turrialba, Costa Rica. 72 p.
81. Verano, F. 1991. Moniliasis del cacao (*Moniliophthora roreri*). Federación Nacional de Cacaoteros. Fondo Nacional del Cacao. Bogotá. Col. 13 p.
82. Zubiarte, L. 2011. Puro desarrollo. /Revista "INFORMATIVO". / edición 49. Año II. Pg. 13

RESUMEN

Con el objeto de seleccionar hongos endófitos procedentes del Alto Amazonas con capacidad de biocontrol a *Moniliophthora roreri* y *Phytophthora palmivora*, patógenos de cacao (*Theobroma cacao* L.). Se seleccionó al azar 46 aislamientos pertenecientes a 10 géneros de hongos endófitos (*Pestalotiopsis*, *Colletotrichum*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Clonostachys*, *Botryosphaeria*, *Acremonium* y *Xylaria*) para evaluar la capacidad antagónica y eficiencia de hongos endófitos, lo cual se desarrolló en el laboratorio de Fitopatología del Instituto de Cultivos Tropicales (ICT), ubicado en el distrito de la Banda de Shilcayo, provincia y departamento de San Martín. Para la prueba de Antibiosis, se produjeron metabolitos secundarios de los biocontroladores en caldo MIN, donde se evaluó el porcentaje de inhibición micelial de los patógenos; y para la prueba de Micoparasitismo se utilizó el método de placas pre colonizadas por los patógenos, donde se evaluó el porcentaje de colonización. Para las pruebas de eficiencia de biocontrol de *M. roreri* se empleó el método de cilindros de tejidos de frutos de cacao infectados con monilia; así mismo, para probar la eficiencia de biocontrol de *P. palmivora* se utilizó el método de discos de hojas. En la prueba de antibiosis, los metabolitos secundarios del aislamiento As-E-3, del género *Aspergillus*, tuvieron mayor efecto en la inhibición micelial de *M. roreri* y *P. palmivora* con 95,13% y 100% respectivamente. En la prueba de micoparasitismo a *Moniliophthora roreri*, cinco aislamientos pertenecientes al género *Trichoderma* resultaron ser micoparasitos agresivos, los únicos que completamente colonizaron al patógeno. Sin embargo, los aislamientos de los géneros *Aspergillus* (As-E-6, As-E-5, As-E-3, As-E-1), *Botryosphaeria* (todos aislamientos), *Trichoderma* (T-E-166, T-E-5) y *Xylaria* (X-E-55) fueron los que mostraron ser micoparasitos muy agresivos para *Phytophthora palmivora*. Por otro lado, la eficiencia de los hongos endófitos contra *M. roreri* en presencia de metabolitos secundarios, el aislamiento P-E-168 presentó mayor inhibición con 97,85 %; mientras que, en la prueba con suspensión de conidias muestran que todos los aislamientos de *Trichoderma* ejercieron un efecto antagónico sobre el patógeno, superando el 90 % de inhibición de la esporulación. En las pruebas de eficiencia de metabolitos secundarios y suspensión de conidias en el control de la infección de *P. palmivora* en discos de hojas, el aislamiento As-E-3 del género *Aspergillus* mostró mayor efecto antagónico sobre la infección del patógeno sobre el tejido, obteniendo menor grado de severidad de la enfermedad de 0,05 y 1,93 para metabolitos y suspensión de conidias respectivamente.

SUMMARY

In order to select endophytes fungal from Alto Amazonas with biocontrol ability to *M. roreri* and *P. palmivora*, pathogens of cacao (*Theobroma cacao* L.) and were selected at random 46 isolates belonging to 10 genera of endophytes fungal (*Pestalotiopsis*, *Colletotrichum*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Clonostachys*, *Botryosphaeria*, *Acremonium* and *Xylaria*) to evaluate the antagonistic capacity and efficiency of endophytes, which was developed in Plant Pathology laboratory of Instituto de Cultivos Tropicales (ICT), located in the district of La Banda de Shilcayo, province and department of San Martín. For the test of Antibiosis were produced secondary metabolites of endophytes in MIN broth, and was evaluated the percentage of mycelial inhibition of pathogens, and to the test of mycoparasitism was used the method of plate pre-colonized by pathogens, and was assessed of colonization percentage. For testing the efficiency of biocontrol of *M. roreri* was used the cylinder method of cocoa fruit tissues infected with monilia, likewise, to test the efficiency of biocontrol of *P. palmivora*, the method of leaf discs. In the antibiosis test, secondary metabolites of isolation As-E-3 from genus *Aspergillus*, had greater effect on mycelial inhibiting of *M. roreri* and *P. palmivora* with 95.13% and 100% respectively. In testing of mycoparasitism to *M. roreri* five isolates belonging to *Trichoderma* resulted being aggressive mycoparasites that completely colonized the pathogen. However, the isolates of *Aspergillus* genera (As-E-6, As-E-5, As-E-3 As-E-1), *Botryosphaeria* (all isolates), *Trichoderma* (T-E-166, T-E-5) and *Xylaria* (X-E-55) were the ones who proved to be very aggressive mycoparasite for *P. palmivora*. On the other hand, the efficiency of endophytes against *M. roreri* in presence of secondary metabolites, isolation P-E-168 (*Pestalotiopsis*) showed greater inhibition with 97.85%; while in the conidial suspension test showed that all isolates of *Trichoderma* had an antagonistic effect on the pathogen, exceeding 90% of sporulation inhibition. In tests of efficiency of secondary metabolites and conidial suspension in the control of *P. palmivora* in leaf discs, isolation As-E-3 of *Aspergillus* showed greater antagonistic effect on infection of pathogens, and resulted smaller degree of severity of disease of 0.05 and 1.93 for metabolites and suspension conidia respectively.

ANEXOS

ANEXO 1: Prueba de Duncan de antibiosis de hongos endófitos contra *M. royeri*.

Aislamiento	%inhibición	Test Duncan
Acr-E-3	11,9	m-p
Acr-E-4	14,57	k-p
Acr-E-6	20,45	f-l
As-E-1	43,8	d
As-E-2	17,5	g-m
As-E-3	95,13	a
As-E-4	31,4	e
As-E-5	30,71	e
As-E-6	62,11	b
Bo-E-107	23,5	e-j
Bo-E-131	25,63	e-g
Bo-E-184	26,3	ef
Bo-E-199	65,42	b
Bo-E-72	11,08	m-p
Cl-E-109	22,45	e-k
Cl-E-119	22,9	e-k
Cl-E-123	24,45	e-j
Cl-E-43	10,61	m-p
Cl-E-55	8,93	op
Coll-E-11	9,71	m-p
Coll-E-23	9,65	m-p
Coll-E-28	16,49	h-n
Coll-E-73	8,94	p
Coll-E-79	15,53	j-p
F-E-182	16,02	i-o
F-E-187	14,47	l-p
F-E-195	8,91	op
F-E-38	20,41	f-l
F-E-85	27,65	ef
P-E-168	29,34	ef
P-E-251	13,43	l-p
P-E-352	24,32	e-i
P-E-71	9,52	m-p
Pen-E-1	42,97	d
Pen-E-10	8,07	p
Pen-E-4	26,17	ef
Pen-E-6	25,13	e-h
Pen-E-8	43,1	d
T-E- 166	3,36	q
T-E- 17	47,09	cd
T-E- 175	55,63	bc
T-E- 5	2,86	q
T-E- 50	1,7	q
X-E-32	8,66	op
X-E-55	9,59	m-p
X-E-76	9,05	n-p

Letras distintas indican diferencias significativas

ANEXO 2: Prueba de Duncan de antibiosis de hongos endófitos contra *P. palmivora*.

Aislamientos	% inhibición	Test Duncan
Acr-E-3	6,95	n-r
Acr-E-4	5,84	o-s
Acr-E-6	3,48	q-s
As-E-1	87,57	b
As-E-2	27,07	hi
As-E-3	100	a
As-E-4	77,42	c
As-E-5	80,8	bc
As-E-6	87,71	b
Bo-E-107	18,77	i-k
Bo-E-131	3,75	p-s
Bo-E-184	2,88	rs
Bo-E-199	56,03	d
Bo-E-72	14,68	j-m
Cl-E-109	50,35	de
Cl-E-119	13,49	k-n
Cl-E-123	2,31	s
Cl-E-43	38,66	fg
Cl-E-55	20,51	i-k
Coll-E-11	7,85	n-r
Coll-E-23	3,8	o-s
Coll-E-28	20,51	i-k
Coll-E-73	2,33	rs
Coll-E-79	14,82	j-m
F-E-182	18,94	i-k
F-E-187	9,22	l-o
F-E-195	8,08	m-q
F-E-38	8,08	m-q
F-E-85	48,36	d-f
P-E-168	9,58	m-o
P-E-251	16,48	i-l
P-E-352	42,75	ef
P-E-71	56,48	d
Pen-E-1	75,75	c
Pen-E-10	71,53	c
Pen-E-4	30,38	gh
Pen-E-6	99,46	a
Pen-E-8	81,88	bc
T-E- 166	21,7	h-j
T-E- 17	39,08	fg
T-E- 175	8,28	m-q
T-E- 5	7,46	n-r
T-E- 50	41,03	ef
X-E-32	20,86	i-k
X-E-55	5,74	o-s
X-E-76	8,6	m-p

Letras distintas indican diferencias significativas

ANEXO 3: Prueba de Duncan de micoparasitismo de hongos endófitos contra *P. palmivora*.

Aislamientos	% micoparasitismo	Test Duncan
Acr-E-3	0	g
Acr-E-4	0	g
Acr-E-6	0	g
As-E-1	100	a
As-E-2	70	c
As-E-3	100	a
As-E-4	90	a
As-E-5	100	a
As-E-6	100	a
Bo-E-107	100	a
Bo-E-131	100	a
Bo-E-184	100	a
Bo-E-199	100	a
Bo-E-72	100	a
Cl-E-109	0	g
Cl-E-119	30	de
Cl-E-123	0	g
Cl-E-43	0	g
Cl-E-55	0	g
coll-E-11	33,33	d-f
Coll-E-23	0	g
Coll-E-28	0	g
Coll-E-73	0	g
Coll-E-79	17,78	ef
F-E-182	0	g
F-E-187	0	g
F-E-195	0	g
F-E-38	0	g
F-E-85	0	g
P-E-168	86,67	bc
P-E-251	15	ef
P-E-352	40	d
P-E-71	80	bc
Pen-E-1	10	f
Pen-E-4	0	g
Pen-E-6	15	ef
Pen-E-8	26,67	d-f
T-E- 166	100	a
T-E- 17	13,33	f
T-E- 175	43,33	d
T-E- 5	100	a
T-E- 50	0	g
X-E-32	0	g
X-E-55	100	a
X-E-76	0	g

Letras distintas indican diferencias significativas

